

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LES  
CELLULES KURLOFF DE COBAYE ET ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DES  
SOUS-POPULATIONS DE CELLULES KURLOFF

par

FRANÇOIS BLANCHETTE

Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)

Avril 1994



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street  
Ottawa, Ontario  
K1A 0N4

Bibliothèque nationale  
du Canada

Direction des acquisitions et  
des services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0N4

*Your file    Votre référence*

*Our file    Notre référence*

**The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.**

**L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.**

**The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

ISBN 0-315-93022-5

**Canada**



À Nattacha,  
pour son amour  
et son support moral

## TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	II
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII
Résumé.....	IX
<b>1.0 Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Découverte des cellules Kurloff.....	2
1.2 Augmentation du nombre de cellules Kurloff.....	3
1.2.1 Facteurs hormonaux.....	3
1.2.2 Facteurs non-hormonaux.....	5
1.3 Morphologie des cellules Kurloff.....	6
1.4 Caractéristiques du corps d'inclusion.....	6
1.5 Distribution tissulaire des cellules Kurloff.....	8
1.6 Activités et fonctions potentielles des cellules Kurloff.....	10
1.7 Origine des cellules Kurloff.....	12
1.8 Classification des cellules Kurloff.....	14
1.9 Activité NK (natural killer).....	15
1.10 Objectifs du travail.....	17
<b>2.0 Matériel et méthodes.....</b>	<b>18</b>
2.1 Animaux.....	19
2.2 Isolement des cellules Kurloff et de leurs sous-populations.....	19
2.2.1 La rate.....	20
2.2.2 Le sang.....	23
2.2.3 La moëlle osseuse.....	23

2.3	Purification des autres types cellulaires.....	24
2.3.1	Les éosinophiles alvéolaires.....	24
2.3.2	Les neutrophiles alvéolaires.....	25
2.3.3	Les macrophages alvéolaires.....	25
2.3.4	Les lymphocytes spléniques.....	26
2.3.5	Les monocytes spléniques.....	27
2.4	Colorations des cellules Kurloff.....	28
2.4.1	La coloration au P.A.S.....	28
2.4.2	La coloration au réactif de Papanicolaou.....	29
2.5	Production d'anticorps monoclonaux.....	29
2.6	Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	33
2.6.1	Tests ELISA.....	33
2.6.2	Cytométrie de flux.....	35
2.6.3	Détermination de l'isotype des anticorps monoclonaux.....	36
2.6.4	Immunofluorescence.....	37
2.6.5	ImmunoGold.....	37
2.7	Essais de cytotoxicité.....	38
2.7.1	Cellule cible tumorale.....	38
2.7.2	Marquage de la cellule cible.....	39
2.7.3	Cytotoxicité des sous-populations.....	39
2.7.4	Effet de l'anticorps monoclonal 14D1 sur l'activité NK.....	41
2.8	Analyses statistiques.....	41
<b>3.0</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>42</b>
3.1	Nombre de cellules Kurloff dans le sang.....	43
3.2	Nombre de cellules Kurloff dans la moëlle osseuse.....	43
3.3	Nombre de cellules Kurloff dans la rate.....	46

3.4	Corrélation entre le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans les divers tissus et organes.....	48
3.5	Identification des cellules Kurloff par la coloration au P.A.S.....	50
3.6	Sélection des clones par ELISA.....	50
3.7	Sélection des clones par titrage ELISA.....	53
3.8	Sélection des clones par cytométrie de flux.....	53
3.9	Détermination de l'isotype des anticorps monoclonaux.....	55
3.10	Purification des sous-populations de cellules Kurloff.....	57
3.11	Morphologie des sous-populations de cellules Kurloff.....	57
3.12	Marquage des sous-populations de cellules Kurloff par les anticorps monoclonaux.....	60
3.13	Marquage des cellules Kurloff par immunofluorescence.....	62
3.14	Marquage des cellules Kurloff par la technique d'ImmunoGold...	64
3.15	Marquage des sous-populations de cellules Kurloff par les anticorps anti-CD16h et anti-CD56h.....	66
3.16	Activité cytotoxique des sous-populations de cellules Kurloff.....	66
3.17	Modulation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff par le 14D1.....	69
4.0	<b>Discussion.....</b>	71
5.0	<b>Conclusions.....</b>	84
6.0	<b>Remerciements.....</b>	87
7.0	<b>Bibliographie.....</b>	90
8.0	<b>Appendice.....</b>	113
8.1	Liste d'article.....	114
8.2	Liste de résumés.....	114



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Isolement des sous-populations de cellules Kurloff.....	21
Figure 2.	Production d'anticorps monoclonaux.....	30
Figure 3.	Effet de l'œstradiol sur le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans le sang.....	44
Figure 4.	Effet de l'œstradiol sur le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la moëlle osseuse.....	45
Figure 5.	Effet de l'œstradiol sur le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la rate.....	47
Figure 6.	Corrélations entre le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la moëlle osseuse, la rate et le sang.....	49
Figure 7.	Coloration au P.A.S. des cellules Kurloff.....	51
Figure 8.	Sélection des clones par ELISA.....	52
Figure 9.	Sélection des clones par cytométrie de flux.....	56
Figure 10.	Morphologie des sous-populations de cellules Kurloff.....	59
Figure 11.	Marquage des sous-populations de cellules Kurloff par les anticorps monoclonaux.....	61
Figure 12.	Marquage des cellules Kurloff par immunofluorescence.....	63
Figure 13.	Marquage des cellules Kurloff par la technique d'ImmunoGold.....	65
Figure 14.	Marquage des sous-populations de cellules Kurloff par les anticorps anti-CD16h et anti-CD56h.....	67
Figure 15.	Activité cytotoxique des sous-populations de cellules Kurloff.....	68



**LISTE DES FIGURES (suite)**

Figure 16. Modulation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff par l'anticorps monoclonal 14D1.....	70
--	----

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I.	Sélection des clones par titrage (ELISA).....	54
Tableau II.	Purification des sous-populations de cellules Kurloff.....	58

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac:	anticorps
Acm:	anticorps monoclonaux
ADCC:	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (antibody dependant cellular cytotoxicity)
BAL:	lavage bronchoalvéolaire (bronchoalveolar lavage)
BHR:	hyperréactivité bronchique (bronchial hyperreactivity)
BSA:	albumine sérique bovine (bovine serum albumin)
ELISA:	essai de liaison enzymatique (enzyme immuno-sorbent assay)
FBS:	sérum de veau fœtal (fetal bovine serum)
GTP:	guanosine triphosphate
HAT:	hypoxanthine, aminoptérine, thymidine
HPGRT:	hypoxanthine guanine phosphoryl transphérase
IL-2:	interleukine-2
LTA <sub>4</sub> :	leucotriène A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub> :	leucotriène B <sub>4</sub>
MHC:	complexe majeur d'histocompatibilité (major histocompatibility complex)
NK:	tueuse naturelle (natural killer)
OPD:	o-phénylènediamine dihydrochlorure
OPI:	oxaloacétate, pyruvate de sodium, insuline
P.A.S.:	acide périodique Schiff (periodic acid Schiff)
PGE <sub>2</sub> :	prostaglandine E <sub>2</sub>
TK:	thymidine kinase

## RÉSUMÉ

### PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LES CELLULES KURLOFF DE COBAYE ET ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES KURLOFF

par  
François Blanchette

Mémoire présenté au Département de pharmacologie  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.).  
Faculté de médecine, Université de Sherbrooke

Les cellules Kurloff sont des cellules mononucléaires de cobaye caractérisées par la présence d'un grand corps d'inclusion prenant la coloration P.A.S. (Periodic Acid Schiff). Les cellules Kurloff sont présentes dans divers tissus et organes mais elles sont plus nombreuses chez la femelle que chez le mâle. Leur nombre augmente significativement pendant la grossesse et sous l'effet de l'administration d'œstrogènes. Les cellules Kurloff possèdent une activité cytotoxique tueuse naturelle (NK) contre diverses cellules cibles tumorales et cette activité NK est indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC). Les buts principaux de notre étude étaient de déterminer l'effet du traitement aux œstrogènes sur l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans divers tissus et organes et de produire des anticorps monoclonaux (Acm) contre ces cellules afin de mieux les caractériser. Nous nous sommes intéressés à la mesure de l'activité NK au niveau des 5 sous-populations de cellules Kurloff identifiées selon leur densité. Nous avons aussi étudié la reconnaissance de ces sous-populations par les Acm anti-cellules Kurloff ainsi que l'effet d'un de ces Acm (le 14D1) sur l'activité NK. Nos résultats ont montré que l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans la rate au cours du traitement hormonal est proportionnelle à l'augmentation du nombre de ces cellules dans la moëlle osseuse. Les 5 sous-populations de cellules Kurloff purifiées par différents gradients continus de Percoll (densité cellulaire: 1.048, 1.062, 1.076, 1.087 et 1.100 g/ml) sont reconnues par les 8 Acm préalablement sélectionnés. Ces Acm ont été sélectionnés à l'aide des techniques d'ELISA et de cytométrie de flux pour leur reconnaissance sélective des cellules Kurloff et pour leur titre. Des études d'immunofluorescence et d'ImmunoGold ont montré que les Acm anti-cellules Kurloff reconnaissent autant les cellules Kurloff provenant de cobayes témoins que de cobayes traités aux œstrogènes. Un certain pourcentage (entre 55 et 70 %) des cellules Kurloff ont été reconnus par l'Acm anti-CD56h qui est un marqueur très spécifique des cellules NK humaines et de rat. Nos expériences de relâchement spécifique de  $^{51}\text{Cr}$  ont montré que les cellules Kurloff de plus faible densité (1.048 à 1.076 g/ml) possèdent l'activité NK la plus importante. Enfin l'Acm produit par le clone 14D1 ne semble pas moduler l'activité NK des cellules Kurloff.

# **INTRODUCTION**



## 1.1 DÉCOUVERTE DES CELLULES KURLOFF

La présence chez le cobaye d'une cellule mononucléaire caractérisée par un corps d'inclusion cytoplasmique est connue depuis plus de 100 ans. Cette cellule porte le nom d'un des premiers chercheurs qui l'a décrite. La cellule Kurloff a été identifiée pour la première fois par deux groupes indépendants soit celui de KURLOFF (1889) à Frankfurt et celui de FOÀ et CARBONNE (1889) à Turin. Au cours d'études sur les cellules sanguines de cobayes splénectomisés, KURLOFF (1889) remarqua un ensemble de cellules qu'il décrivit comme "des cellules caractéristiques de cobaye possédant une grande vacuole cytoplasmique ressemblant à un noyau et contenant un *SEKRETSTOFF* élaboré par la cellule." Selon KURLOFF (1889), ces cellules représentaient 15 à 20% des leucocytes sanguins chez le cobaye.

À la même époque, l'équipe de FOÀ et CARBONNE (1889) étudiaient les cellules spléniques de mammifères. Chez le cobaye, ils firent une description beaucoup plus détaillée à l'aide d'illustrations axées sur la morphologie typique des cellules Kurloff. Ils observèrent aussi la présence de ces cellules à inclusion cytoplasmique au niveau du sang périphérique et en quantité moindre au niveau de la moëlle osseuse. Ces différents chercheurs avaient découvert le même type cellulaire chez le cobaye.

Cependant, l'observation la plus importante de ces deux groupes de chercheurs fût que le nombre de cellules Kurloff augmentait de façon considérable chez les cobayes femelles en état de gestation. LEDINGHAM (1906) fit la même observations 17 ans plus tard.

## **1.2 AUGMENTATION DU NOMBRE DE CELLULES KURLOFF**

Les facteurs stimulant la production de cellules Kurloff se divisent en deux groupes: 1) les facteurs hormonaux et 2) les facteurs non-hormonaux.

### **1.2.1 Les facteurs hormonaux**

Suite aux travaux de LEDINGHAM (1906), PAPPENHEIM (1914), ALEXIEFF et JOUKOFF (1928 b) et SEMENSKAJA (1930) qui rapportèrent un nombre accru en cellules Kurloff chez les cobayes femelles gestantes, plusieurs auteurs (revue par REVELL, 1977) ont voulu établir une corrélation entre la sécrétion d'hormones sexuelles et l'augmentation du nombre de cellules Kurloff. ALEXIEFF et JOUKOFF (1928 a,b) ont suggéré pour la première fois, qu'il existait un lien entre le nombre de cellules Kurloff et les hormones sexuelles. Ils ont observé que les cellules Kurloff apparaissaient au début de la maturité sexuelle. Les travaux de KOLMER (1912), confirmés par ALEXIEFF et JOUKOFF (1928 a,b) ont démontré l'absence de cellules Kurloff dans le sang et dans la rate de cobayes mâles et femelles 6 semaines après castration. De plus, l'administration d'extraits d'organes sexuelles (spermine et ovaricine) rétablissait la présence des cellules Kurloff chez ces animaux castrés.

Divers groupes de chercheurs italiens (VALLE, 1933; TOSATTI, 1938 et BABUDIERI, 1938) ont décrit la même observation après l'injection d'hormones sexuelles. Les effets de l'œstradiol et de la

testostérone sur les niveaux de cellules Kurloff furent étudiés d'avantage par LEDINGHAM (1940). Ce dernier démontra clairement que la testostérone était moins efficace que l'œstradiol pour induire une augmentation du nombre de cellules Kurloff. Il nota aussi que le nombre de cellules Kurloff sanguines chez les cobayes femelles était influencé par leur cycle de production d'œstrogènes (période de 16 jours).

LEDINGHAM (1940) et DEBOUT et coll. (1983) ont démontré que la taille et le nombre de cellules Kurloff augmentaient considérablement en réponse à l'injection d'œstradiol chez les cobayes mâles et femelles. Cette augmentation n'était pas immédiate, mais apparaissait plutôt quelques (5-6) jours après l'administration d'œstradiol. SANDBERG et HAGELIN (1986) ont tenté, sans succès, d'induire *in vitro* la formation de cellules Kurloff provenant du thymus, de la rate et de la moëlle osseuse en présence de sérum de cobayes œstrogénés. Ces auteurs conclurent que l'action de l'œstradiol était indirecte puisque son temps d'action *in vivo* était de 5 jours (DEBOUT et coll., 1983) et qu'il ne semblait pas y avoir de récepteurs pour cette hormone sur les cellules Kurloff (LANDEMORE et coll., 1983). Ces mêmes chercheurs démontrèrent finalement la présence d'un récepteur de faible affinité pour l'œstradiol sur des extraits cellulaires de cellules Kurloff (LANDEMORE et coll. 1988). Le mécanisme d'induction de cellules Kurloff via l'œstradiol n'est toujours pas connu.

Parallèlement, il a été démontré chez d'autres espèces que les niveaux de cellules possédant une activité NK étaient aussi modulés par la présence d'hormones sexuelles. Par exemple, des études préliminaires effectuées chez la souris ont montré que les œstrogènes diminuent la



population cellulaire possédant une activité NK (SEAMAN et coll., 1978; HANNA et SCHNEIDER, 1983). SCREPANTI et coll. (1987) ont montré que l'augmentation de la formation des cellules NK de souris est biphasique et dépend de la durée et de la dose utilisée lors du traitement hormonal. Chez la femme, GARZETTI et coll. (1993) ont montré que l'activité NK est proportionnelle au niveau d'œstradiol sérique.

### 1.2.2 Les facteurs non-hormonaux

Au début du siècle, plusieurs auteurs ont décrit une augmentation du nombre de cellules Kurloff chez le cobaye suite à l'administration de substances différentes des œstrogènes. L'injection intrapéritonéale de *Vibrio nassig* (SCHILLING, 1909) augmente le nombre de cellules Kurloff chez le cobaye. SEMENSKAJA (1930) a démontré que le nombre de cellules Kurloff diminue rapidement lorsque l'infection bactérienne est importante mais que cette situation change considérablement dans la période de récupération. Cet auteur a suggéré un rôle immunitaire pour les cellules Kurloff. Ce même auteur a démontré que l'avitaminose C est la seule déficience vitaminique qui augmente le nombre de cellules Kurloff. Par contre, l'administration de vitamine D augmentait aussi le nombre de cellules Kurloff (FLORENTIN et BINDER, 1940).

Plus récemment, SEWELL et coll. (1988) et THOMPSON et coll. (1988) ont montré que la cyclophosphamide agit en synergie avec un autre immunosuppresseur, la cyclosporine A, pour induire la formation de cellules Kurloff chez le cobaye. Le même traitement chez le rat augmente aussi le nombre de cellules NK dans la rate des rats traités. A l'aide

d'anticorps monoclonaux spécifiques d'antigènes de surface, l'analyse des cellules Kurloff retrouvées dans la rate après ce traitement a montré que leur phénotype (CT7<sup>+</sup>, MSgp12<sup>-</sup>, CT6<sup>-</sup>) est analogue à une population lymphocytaire humaine capable de médier une activité NK (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>).

### **1.3 MORPHOLOGIE DES CELLULES KURLOFF**

La cellule Kurloff est principalement caractérisée par la présence d'une inclusion cytoplasmique imposante et par un ratio cytoplasme/noyau élevé. Ce corps d'inclusion dense aux électrons peut être identifié par la coloration au P.A.S. (Periodic Acid Schiff).

Les principales caractéristiques des cellules Kurloff observées en microscopie électronique sont; 1) un corps d'inclusion dense aux électrons, 2) la présence extensive de réticulum rugueux et de ribosomes libres généralement situés entre le noyau et le corps d'inclusion, 3) un appareil de Golgi bien développé, 4) la présence de patrons de myélines et de mitochondries situées en périphérie du corps d'inclusion et 5) l'absence de lysosomes et de phagosomes (REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976; REVELL et coll., 1977 pour revue).

### **1.4 CARACTÉRISTIQUES DU CORPS D'INCLUSION**

La cellule Kurloff a été étudiée à cause de la présence de cette inclusion cytoplasmique très caractéristique de cette cellule. Diverses théories sur la nature et la composition de cette inclusion dérivent de son



comportement suite à des fixations et des colorations cellulaires (voir REVELL 1977; LEDINGHAM 1940 pour revues).

Certains chercheurs du début du siècle ont proposé que le corps d'inclusion était plutôt un parasite (de type spirochète ou rickettsi) ingéré par la cellule Kurloff (LEDINGHAM 1906; ROSS 1912). Cette hypothèse a été rapidement éliminée puisqu'il n'a pas été possible d'induire une infection parasitaire chez d'autres espèces après l'injection des inclusions de cellules Kurloff (LEDINGHAM 1940; REVELL 1977, pour revues). WOODCOCK (1921) a avancé l'hypothèse phagocytaire en suggérant que le corps d'inclusion représentait un érythrocyte phagocyté. Ces travaux étaient basés sur la détection de fer au niveau de l'inclusion. Plusieurs auteurs n'ont pu confirmer cette hypothèse au moyen de méthodes chimiques. Plus récemment, des expériences effectuées par WELSH (1966) et par BERENDSEN (1979) ont montré que la cellule Kurloff ne possédait pas d'activité phagocytaire. L'hypothèse nucléaire proposée par LEINATI (1932) est basée sur des observations microscopiques d'après lesquelles l'auteur concluait que le corps d'inclusion se formait suite à une dégénérescence du matériel nucléaire. KURLOFF (1889) émit l'hypothèse selon laquelle le corps d'inclusion était d'origine endogène et était sécrété par la cellule Kurloff. Cette hypothèse a été supportée par les travaux de REVELL et coll. (1971) qui ont décrit la présence de cellules Kurloff qui étaient entourées par un nuage de fines gouttelettes P.A.S.-positives au niveau du placenta. De plus, MARSHALL et coll. (1971) ont suggéré que les cellules Kurloff libèrent leurs corps d'inclusion dans les canaux vasculaires du placenta. Par la suite, plusieurs auteurs (MARSHALL et SWETTENHAM 1969; MUIR ET MARSHALL 1961; DEAN et MUIR 1970;

LANDEMORE et coll., 1984, LANDEMORE et coll., 1986; LETAIEF et coll., 1989) ont confirmé la production interne de l'inclusion cytoplasmique et ont montré qu'elle est composée de complexes de chondroïtine sulphate-glycosaminoglycan, de mucoprotéines et de mucopolysaccharides. DEAN et MUIR (1971) ont montré la présence de protéoglycans du même type chez les cellules spléniques humaines, de rat, de porc et de mouton.

Beaucoup de travaux ont été réalisés pour mettre en évidence la nature lysosomale du corps d'inclusion. Une forte activité phosphatase acide et triméthaphosphatase a été observée par TIFON et coll. (1986) et par LANDEMORE et coll. (1987), tandis que BUAT et coll. (1988) ont décrit une activité arylsulphatase à la périphérie du corps d'inclusion. La nature lysosomale du corps d'inclusion est supporté par la co-existence d'enzymes et de glycosaminoglycans. Les lysosomes primaires de leucocytes (AVILA et CONVIT 1975; PARMLEY et coll., 1979) et plus particulièrement les granules de cellules NK humaines (MacDERMOTT et coll., 1985; PARMLEY et coll., 1985) possèdent un tel arrangement. Dans ce dernier cas, on dit que les glycosaminoglycans emmagasinent les enzymes cytolytiques et préviennent leur activation anti-tumorale prématurée.

## **1.5 DISTRIBUTION TISSULAIRE DES CELLULES KURLOFF**

Depuis la découverte des cellules Kurloff dans le sang par KURLOFF (1889) et dans la rate par FOÀ et CARBONNE (1889), plusieurs études ont porté sur la distribution tissulaire des cellules Kurloff (REVELL et coll., 1971; KORTELAINEEN et KORHONEN 1976 b). En général, les



cellules Kurloff sont retrouvées en grand nombre dans les organes richement vascularisés et leur nombre dépend du traitement hormonal employé. La rate est l'organe le plus utilisé pour la purification de ces cellules. Dans cet organe, les cellules Kurloff sont présentes exclusivement dans la pulpe rouge alors que dans le thymus, elles sont retrouvées surtout au niveau du cortex (ERNSTROM et SANDBERG 1971; REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976; ALTMAN et RAPP 1978).

Les cellules Kurloff sont aussi retrouvées en grand nombre dans les capillaires des alvéoles pulmonaire, dans les canaux vasculaires du foie et dans les vaisseaux sanguins périphériques (LENDRUM 1952; REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976; KITTAS et coll., 1979). Des études histologiques ont montré que ces cellules sont moins nombreuses dans la moëlle osseuse (REVELL et coll., 1971; IZARD et coll., 1976) et sont pratiquement absentes au niveau des nodules lymphatiques (ERNSTRÖM et SANDBERG 1971; REVELL et coll., 1971; cités par SANDBERG et HAGELIN 1990). REVELL et coll. (1971) et MARSHALL et coll. (1971) ont observé la présence de cellules Kurloff dans les canaux vasculaires du placenta. Il est intéressant de noter que ces cellules sont moins nombreuses dans la zone spongieuse du syncytiotrophoblaste, région contenant uniquement le sang maternelle.

Des cellules capables d'activité NK chez le cobaye ont été retrouvées dans différents compartiments lymphoïdes. Cette activité est prédominante dans la rate, moyenne dans le sang et les ganglions et nulle dans le thymus. Un traitement aux œstrogènes augmente la population de cellules Kurloff dans toutes les régions sans modifier l'activité lytique, à

l'exception du thymus, où elle augmente considérablement (EREMIN et coll., 1980 a). Il semble que la distribution des cellules Kurloff soit proportionnelle à l'activité NK retrouvée dans les différents organes et tissus à l'exception du thymus. TORTEN et coll. (1982) et TORIBIO et coll. (1983) ont montré que des cellules provenant de thymus humains peuvent aussi développer une activité NK, *in vitro*, en présence d'interleukine 2 (IL-2).

## **1.6 ACTIVITÉS ET FONCTIONS POTENTIELLES DES CELLULES KURLOFF**

Le rôle des cellules Kurloff chez le cobaye demeure toujours incertain. MARSHALL et coll. (1970, 1971) ont été les premiers à proposer un rôle fonctionnel substantiel pour le corps d'inclusion de la cellule Kurloff. Ils ont suggéré que la cellule Kurloff peut jouer un rôle dans la protection du placenta contre les mécanismes de défense immunitaire de la mère. Ils ont observé des gouttelettes fluorescentes à l'extérieur des cellules Kurloff dans les canaux vasculaires du placenta à l'aide d'anticorps anti-protéoglycans par la technique d'immunofluorescence. Le processus d'extrusion du matériel composant le corps d'inclusion est décrit d'avantage par LANDEMORE et coll. (1983 a). A l'aide de microscopie à balayage, ces auteurs ont observé des pores à surface lisse sur la paroi cellulaire externe des cellules Kurloff. Ils ont remarqué la formation d'expansion cellulaire à travers l'un de ces pores ainsi que l'existence d'un corps d'inclusion sous forme libre. Ces observations les ont amené à conclure qu'il s'agit d'un processus physiologique semblable à la dégranulation des basophiles décrit par DVORAK et coll. (1981).



MacDERMOTT et coll., (1985) et SCHMIDT et coll. (1985) ont rapporté le phénomène d'exocytose des protéoglycans chez les cellules NK humaines. Des récentes études ont suggéré l'implication des cellules NK dans la défense immunologique du placenta (PARR et coll., 1990). De plus, il a été démontré que les glycosaminoglycans du corps d'inclusion dérivés de protéolyses inhibent *in vitro* la migration des macrophages (REVELL et coll., 1972; DEAN et MUIR 1975), suggérant la non nécessité de l'intégrité du corps protéique du protéoglycan. MARSHALL et coll., (1971) ont préalablement rapporté que les protéoglycans composant le corps d'inclusion de la cellule Kurloff sont spécifiquement cytotoxique pour les macrophages.

D'autres études ont suggéré que les cellules Kurloff peuvent jouer un rôle dans la défense anti-tumorale (EREMIN et coll., 1980 a,b). Les cellules Kurloff possèdent des récepteurs de surface (Fc $\gamma$ R) pour des anticorps cytolytiques (WILSON et COOMBS 1971). EREMIN et coll., (1980 b) ont montré que ces cellules possèdent une activité cytotoxique dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity). Une activité cytotoxique naturelle de type NK (natural killer) (EREMIN et coll., 1980 a; DEBOUT et coll., 1984; POULIOT et coll., 1991) ainsi qu'une activité cytotoxique naturelle de type NC (natural cytotoxic) (POULIOT et coll., 1991) ont été mises en évidence chez les cellules Kurloff. Récemment, DEBOUT et coll. (1993) ont montré que les cellules Kurloff peuvent induire la lyse d'une lignée de cellules leucémiques (LC2) chez le cobaye. Selon ces auteurs, cette caractéristique des cellules Kurloff pourrait expliquer le haut degré de résistance contre l'apparition spontanée ou expérimentale de cancers chez le cobaye.



MAGHNI et coll. (1991) ont montré que les cellules Kurloff sont capables de générer des quantités significatives de prostaglandine  $E_2$  ( $PGE_2$ ) et elles sont aussi capables d'hydrolyser le leucotriène  $A_4$  ( $LTA_4$ ) exogène en leucotriène  $B_4$  ( $LTB_4$ ). La  $PGE_2$  inhibe l'activité NK (DROLLER et coll., 1978; BRUNDA et coll., 1980), tandis que le  $LTB_4$  augmente l'activité cytotoxique (ROLA-PLESZCZYNSKI et coll., 1983). MAGHNI et coll. (1991) ont suggéré que ces éicosanoïdes peuvent faire partie de mécanismes d'autorégulation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff.

## 1.7 ORIGINE DES CELLULES KURLOFF

L'origine thymique des cellules Kurloff a premièrement été suggérée par JOLLY ET FÉRESTER (1929). La présence de colonies de cellules Kurloff dans les régions corticomédulaires du thymus, observée par BIMES et coll. (1964) et RUTH et coll. (1964) a appuyé cette hypothèse. Par comparaison du nombre de cellules Kurloff retrouvées au niveau des vaisseaux afférents et efférents du thymus, de la rate et des nodules lymphoïdes, ERNSTROM et SANDBERG (1971) ont remarqué un nombre plus élevé de cellules Kurloff dans les canaux afférents de la rate. Cette observation suggérait qu'il existait une prolifération de ces cellules au niveau de la rate. Cependant, les hypothèses d'une origine thymique ou splénique n'ont pas été confirmées par les études de thymectomies et de splénectomies, respectivement. RANLOV et coll. (1970) n'ont pu démontrer si la l'absence ou la présence de tissus thymique influence la formation de cellules Kurloff. HEINLE et HEYDINGER (1944) ont même rapporté une augmentation du nombre de ces cellules après traitement aux œstrogènes

chez des cobayes splénectomisés et chez des cobayes non-splénectomisés.

Ces résultats expérimentaux suggèrent la possibilité qu'un autre organe soit impliqué dans la production des cellules Kurloff. KITTAS et coll. (1979) ont suggéré que la moëlle osseuse pourrait être le site de production de ces cellules. ADAMS (1977) a rapporté que la concentration de lymphocytes dans la moëlle osseuse ne changeait pas de façon significative après une thymectomie néonatale, contrairement au sang périphérique. KITTAS et coll. (1979) ont proposé que la genèse des cellules Kurloff et des cellules Kupffer se déroulait au niveau de la moëlle osseuse. Ils ont décrit que le foie de cobaye mâle et femelle traités avec l'hexoestrol pendant une courte période contient plus de cellules Kupffer que les cobayes témoins. Cette observation est en accord avec les découvertes antérieures qui ont décrit une augmentation du nombre de cellules Kupffer suite à l'administration d'œstrogènes (KELLY et coll., 1962; KINSKY et coll. 1969; WARR et SLJIVIC 1973). Un traitement plus long provoque une augmentation du nombre de cellules Kurloff au profit des cellules Kupffer. Cependant, chez la souris (ne possédant pas de cellules Kurloff), le nombre de cellules Kupffer augmente progressivement tout au long du traitement. KITTAS et coll. (1979) n'ont pu démontrer par microscopie optique et électronique qu'il s'agissait d'une transformation des cellules Kupffer en cellules Kurloff. Ces auteurs ont suggéré que le lien entre ces deux types cellulaires était une cellule progénitrice identique (sensible aux œstrogènes) au niveau de la moëlle osseuse.

L'origine des cellules NK chez l'homme et la souris est clairement définie et supporte l'ontogénie de la moëlle osseuse comme pour les



cellules Kurloff. De plus, HALLER et coll. (1977), ROONEY et coll. (1986) et LUM (1987) ont rétabli l'activité cytotoxique chez des humains irradiés grâce à une transplantation de moëlle osseuse.

## 1.8 CLASSIFICATION DES CELLULES KURLOFF

L'appartenance des cellules Kurloff à un type cellulaire lymphocytaire ou monocytaire n'est pas bien établie. Les cellules Kurloff semblent posséder à la fois des propriétés monocytaires et lymphocytaires. REVELL et coll. (1971) ont montré que les cellules Kurloff étaient pratiquement absentes dans la pulpe blanche de la rate, dans le parenchyme du thymus et dans la région folliculaire et paracorticale des ganglions lymphatiques. A l'inverse, ces cellules sont présentes en grand nombre dans la pulpe rouge de la rate comme les monocytes. Contrairement aux lymphocytes, DUPLAN (1956) a montré que le nombre de cellules Kurloff et de monocytes sanguins augmente après irradiation d'un cobaye. Les cellules Kurloff expriment des récepteurs pour des anticorps cytophyliques ( $Fc\gamma R$ ) comme dans le cas des monocytes et des macrophages (WILSON et COOMBS, 1971). Tout comme les cellules de lignée lymphocytaire, les cellules Kurloff ne possèdent pas de lysosomes, ni de phagosomes (REVELL et coll., 1971) et par conséquent, elles ne possèdent donc pas de propriétés phagocytaires (WELSH, 1966; KORTELAINE et KORHONEN, 1976 b; BERENDSEN, 1979). De plus, les cellules Kurloff possèdent une autre caractéristique en faveur de la lignée lymphoïde, soit la présence de récepteurs de surface pour les érythrocytes de lapin traités à la papaine, un marqueur des lymphocytes T chez le cobaye (WILSON et GURNER, 1975).

Plus récemment, DEBOUT et coll. (1991), à l'aide d'anticorps monoclonaux (ELISA et cytométrie de flux) ont exclus toute relation entre les cellules Kurloff et la lignée monocyte/macrophage ainsi que la lignée des lymphocytes B. Ils ont suggéré que les cellules Kurloff exprimant des marqueurs de lymphocytes T peuvent être classifiées dans la classe des lymphocytes possédant une activité NK.

Les cellules NK humaines possèdent aussi des caractéristiques biochimiques et phénotypiques des lignées myéloïdes et lymphoïdes (RODER et PROSS 1982; ORTALDO et HERBERMAN 1984; TRINCHIERI 1989). Les cellules Kurloff sont associées aux lymphocytes dits LGL (Large Granular Lymphocyte) ou grands lymphocytes granuleux, caractérisés par un ratio cytoplasme:noyau élevé. Ces cellules NK ont initialement été caractérisées comme étant non-adhérentes et non-phagocytaires (HERBERMAN et coll., 1979; HERBERMAN et ORTALDO, 1981). Environ 50% d'entre elles forment des rosettes de faible affinité avec des érythrocytes de mouton, une caractéristique des lymphocytes T et NK humains (RODER et PROSS, 1982; HERBERMAN, 1986)

## 1.9 ACTIVITÉ NK (NATURAL KILLER)

Les cellules mononucléaires présentant une cytotoxicité naturelle à médiation cellulaire jouent un rôle très important dans la défense anti-tumorale (HERBERMAN et HOLDEN, 1978; HANNA et BURTON, 1981; PUCETTI et coll., 1980). Les cellules NK constituent la première ligne de défense contre les micro-organismes ou les cellules tumorales



(HERBERMAN et ORTALDO, 1981). JANEWAY (1989) a proposé qu'elles dérivent d'un système immunitaire primitif.

Le mécanisme d'action des cellules NK a été étudié par plusieurs chercheurs (YOUNG et COHN, 1987; TRINCHIERI 1989; LOTZOVA et HERBERMAN 1992, pour revues). Les cellules NK sont capables de lyser des cellules tumorales (TAKASUGI et coll., 1973), des cellules normales (TIMONEN et coll., 1979), des cellules infectées par un virus (ROLAPLESZCZYNSKI, 1980; FITZGERALD et coll., 1983) ou des bactéries (BIRON et WEISH, 1982). Cette activité cytolytique est indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (KARRE et coll., 1991; TRINCHIERI, 1989; RITZ et coll., 1988). De plus, l'initiation de cette fonction ne nécessite pas de pré-sensibilisation de la cellule NK (RITZ, 1989; TRINCHIERI, 1989).

Le mécanisme de lyse comporte diverses étapes. En premier lieu, la cellule effectrice reconnaît divers marqueurs sur la cellule cible et va se lier avec elle (GUNJI et coll., 1989). Cette liaison active la cellule NK et induit la libération de facteurs cytotoxiques tels la perforine et les estérases, contenues dans des granules de sécrétions (FREY et coll., 1982; TARGAN et NEWMAN 1983; WRIGHT et coll., 1983; ATKINSON et coll., 1990). La perforine provoque la formation de pores dans la membrane de la cellule cible ce qui conduit à une cytolyse résultant de la différence de pression osmotique (effet Dunan) (HISERODT et coll., 1982).

## 1.10 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Nous venons de voir que les cellules Kurloff de cobaye ressemblent d'un point de vue biologique aux lymphocytes (LGL) ou cellules NK de diverses espèces de mammifères. L'avantage premier du cobaye comme modèle expérimental provient de la facilité avec laquelle les cellules Kurloff peuvent être purifiées en très grand nombre. L'obtention d'un nombre important de ces cellules a permis à POULIOT et coll. (1991) d'élucider davantage les mécanismes des activités NK et NC des cellules Kurloff

L'objectif principal de ce travail était de produire un anticorps monoclonal qui reconnaîtrait spécifiquement les cellules Kurloff et d'étudier l'activité NK parmi des sous-populations de cellules Kurloff. Cet anticorps permettrait afin d'approfondir nos connaissances au sujet de ces cellules. De plus, nous avons étudié le marquage par cet anticorps des sous-populations de cellules Kurloff afin de déterminer s'il existe une différence d'expression de ce marqueur suivant la sous-population. L'ensemble de ces travaux devrait nous procurer de nouvelles informations sur les cellules Kurloff et ses sous-populations cellulaires.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1 ANIMAUX

Des cobayes femelles Dunkin-Hartley (250-300g) provenant des laboratoires d'élevage Charles River (Charles River Canada Inc., St-Constant, Qué.) ont été utilisés pour nos recherches. Les cobayes traités aux œstrogènes ont reçu un minimum de 3 injections intra péritonéales de 17- $\beta$ -œstradiol-3-benzoate (Sigma Co. Chemical, St-Louis, MO) à une dose de 3 mg/Kg de poids corporel. Le 17- $\beta$ -œstradiol-3-benzoate était mis en suspension dans de la saline 0.9 % apyrogénique. Les animaux étaient sacrifiés par dislocation cervicale 1 semaine après la dernière administration d'œstradiol.

Des souris femelles immunologiquement matures âgées de 6 semaines appartenant à la lignée BALB/c et provenant des laboratoires d'élevage Charles River ont été utilisées pour la production d'anticorps monoclonaux. Ces souris ont été sensibilisées après injection intra péritonéale d'une suspension de cellules Kurloff ( $10 \times 10^6$  cellules Kurloff/100  $\mu$ l PBS) hautement purifiées. Cette opération a été répétée quatre fois toutes les 3 à 4 semaines. Une dernière injection de cellules Kurloff par voie intra-veineuse a été réalisée quatre jours avant la fusion cellulaire d'hybridomes. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale.

## 2.2 ISOLEMENT DES CELLULES KURLOFF ET DE LEURS SOUS-POPULATIONS

Au cours de ces travaux, nous avons déterminé le nombre de

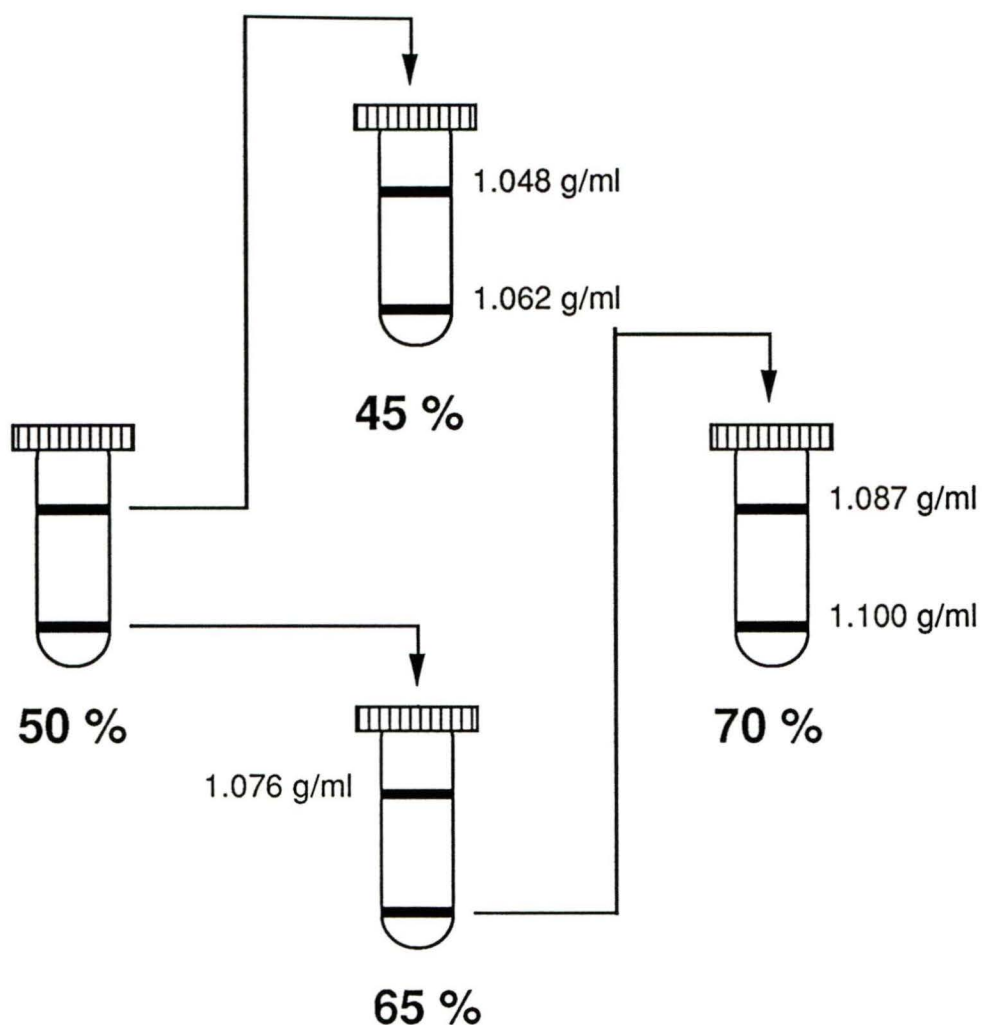


cellules Kurloff retrouvées dans la rate, le sang et la moëlle osseuse.

### 2.2.1 La rate

La rate a été prélevée chez des cobayes femelles traitées aux œstrogènes selon la procédure décrite précédemment. La rate a été disséquée et dissociée mécaniquement dans du PBS (tampon phosphate salin; composition: KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g/L et de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/L dissout dans 900 ml de saline 0.9 % et 90 ml d'H<sub>2</sub>O). La suspension cellulaire a ensuite été filtrée sur filtre de nylon (100 µm) et centrifugée pendant 10 min. à 800 x g. Les globules rouges retrouvées dans le culot cellulaire ont été lysées par choc osmotique réalisé par suspension des cellules spléniques dans une solution de saline 0.2 % (pendant 20 secondes) suivit d'un volume équivalent de saline 1.6 %. Les cellules spléniques ont été recentrifugées pendant 10 min. à 800 x g. Les cellules Kurloff ont été d'abord purifiées sur un gradient de Percoll continu 50 %. (figure 1)

Le Percoll à la concentration de 50 % a été préparé selon la méthode décrite par MAGHNI et coll. (1991) et par PELÉ et coll. (1989). Brièvement, le gradient de Percoll de densité appropriée a été préparé en ajoutant 9 ml d'une solution (0.9 g de NaCl, 1 ml de PBS 100X et 9 ml d'eau distillée) à 111 ml d'une solution commerciale de Percoll (2.26 : 27.74, v/v). Dix millilitres de cette solution de Percoll stock ont été mélangés avec un volume équivalent de PBS et centrifugé à 20 000 x g pendant 15 minutes à 4°C pour former le gradient continu. La suspension cellulaire splénique (80 à 90 x 10<sup>6</sup> cellules/10 ml) a été déposée sur le gradient de Percoll et à nouveau centrifugée à 360 x g pendant 30 min. à la température de la pièce.



**Figure 1: Isolement des sous-populations de cellules Kurloff.** Une suspension de cellules spléniques (80 à 90 cellules/10 ml) a été déposée sur un premier gradient de Percoll continu (50 %). Après une centrifugation (30 min. à 360 x g) les cellules de la bande supérieure ont été déposées sur un gradient de Percoll 45 % et les cellules de la bande inférieure sur un gradient de Percoll 65 %. Après centrifugation de ces diverses fractions, les cellules de la bande cellulaire inférieure du gradient de Percoll 65 % ont été déposées sur un gradient de Percoll 70 %. De cette façon, 5 sous-populations de cellules Kurloff de densités 1.048 à 1.100 g/ml ont été isolées.

Les cellules Kurloff présentes dans la bande supérieure (densités de 1.048 et 1.062 g/ml) et inférieure (densité de 1.076 à 1.100 g/ml) du gradient Percoll continu ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et lavées 2 fois dans 30 ml de PBS ou dans du milieu de culture (milieu standard) composé de RPMI 1640 (Gibco BRL Canada, Burlington, Ont.) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (FBS) (HyClone Laboratories Inc., Logan, Utah), 2g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 80 U/ml de pénicilline G (Glaxo Lab., Montréal, Qué.) et 100 g/ml de streptomycine (Glaxo Lab., Montréal, Qué.). Les cellules Kurloff possédant une densité de 1.076 à 1.100 g/ml et une pureté d'environ 99 % (MAGHNI et coll., 1991) ont été utilisées pour la sensibilisation des souris BALB/c. Le nombre de cellules Kurloff a été déterminé sur un hématimètre et la viabilité cellulaire a été mesuré par la méthode d'exclusion du bleu de Trypan.

Lors de la purification des sous-populations de cellules Kurloff, des gradients de Percoll de diverses concentrations (45 %, 65 % et 70 %) ont été utilisés. Tel qu'illustré à la figure 1, les cellules retrouvées dans la bande supérieure du gradient de Percoll 50 % ont été déposées sur un gradient de Percoll 45 % afin de purifier les deux sous-populations de densité 1.048 et 1.062 g/ml. Les cellules retrouvées dans la bande cellulaire inférieure du gradient de Percoll 50 % ont été déposées sur un gradient de Percoll 65 % afin d'obtenir une sous-population cellulaire purifiée de densité 1.076 g/ml et une population de cellules non-purifiées de densité 1.087 et 1.100 g/ml. Ces deux sous-population ont été finalement purifiées sur un gradient de Percoll 70 % (figure 1).



### 2.2.2 Le sang

Les cellules sanguines de cobaye ont été prélevées par ponction cardiaque à l'aide d'une aiguille hypodermique 18 G. Un volume sanguin variant entre 5 et 9 ml a été récupéré dans une seringue (10 ml) contenant 1 ml de citrate de sodium (3.15 %). Le nombre total de leucocytes a été déterminé après concentration des cellules sanguines par centrifugation sur un gradient de Percoll 67.5 % (élimination des érythrocytes). Pour ce faire, 2 ml de sang ont été dilués dans 8 ml de PBS et cette suspension cellulaire a été déposée sur un gradient continu de Percoll de 67.5 %. Les leucocytes sanguins ont été récupérés dans la bande supérieure du gradient de Percoll. Le nombre de cellules Kurloff par mm<sup>3</sup> de sang a été calculé à l'aide de la formule suivante;

$$\frac{\varnothing \times V}{2(V - 1)} \times 1000 = X \text{ cellules / mm}^3$$

où  $\varnothing$  est le nombre de cellules Kurloff compté par la technique d'hématimètre et V est le volume de sang (ml) obtenu (incluant le 1 ml d'anticoagulant). Le nombre de cellules et la viabilité cellulaire ont été déterminés comme décrit précédemment.

### 2.2.3 La moëlle osseuse

Les cellules totales de la moëlle osseuse ont été isolées des fémurs droits et gauches. Pour ce faire les deux extrémités du fémur ont été sélectionnés et la moëlle osseuse a été récupérée par passage de 10 ml de PBS dans le fémur.

La moëlle osseuse ainsi obtenue a été resuspendue avec une pipette Pasteur et les cellules ont été filtrées sur un filtre de nylon (100  $\mu$ m). Après centrifugation (10 min. à 800 x g) le culot a été suspendu dans 10 ml de PBS. Le nombre de cellules et la viabilité cellulaire ont été déterminés comme décrit précédemment.

## **2.3 PURIFICATION DES AUTRES TYPES CELLULAIRES**

La détermination de la spécificité des anticorps monoclonaux vis à vis des cellules Kurloff a été effectué en comparant la liaison de ces Acm sur d'autres populations cellulaires du cobaye. Les éosinophiles, les neutrophiles et les macrophages alvéolaires, ainsi que les lymphocytes et les monocytes spléniques ont été purifiés pour déterminer la spécificité des Acm obtenus.

### **2.3.1 Les éosinophiles alvéolaires**

Les éosinophiles alvéolaires existent en petit nombre chez le cobaye. Le nombre d'éosinophiles peut être augmenté par l'injection intraveineuse de billes de Sephadex G-50 tel que décrit par MAGHNI et coll. (1993) et ils sont obtenus par lavages bronchoalvéolaires (BAL) de cobayes. Brièvement, des cobayes conscients ont reçu une injection intra veineuse de billes de Sephadex G-50 Superfine (Pharmacia, Uppsala, Suède) à une dose de 24 mg/Kg et ont été sacrifiés 24 heures après par une injection intrapéritonéale de pentobarbitone (60 mg/Kg). La trachée a été canulée à l'aide d'un cathéter lié à un système de valves et une paire de seringues de

60 ml. Une solution de PBS à 37 °C a été infusée dans les poumons par aliquotes de 5 ml (volume totale 50 ml) et a été réaspirée par la deuxième seringue après un léger massage des poumons. Après la lyse des globules rouges, les cellules du BAL ont été déposées sur un gradient continu de Percoll de 65 %. Une population d'éosinophiles normodenses (densités 1.084 à 1.100 g/ml) a été récupérée dans la bande inférieure du gradient. Cette population cellulaire a été lavée deux fois avec 30 ml de PBS et resuspendue dans ce même tampon à une concentration de  $1 \times 10^6$  et de  $10 \times 10^6$  cellules/ml pour les techniques d'ELISA et de cytométrie de flux respectivement.

### **2.3.2 Les neutrophiles alvéolaires**

Les neutrophiles alvéolaires ont aussi été isolés des animaux préalablement traités aux billes de Sephadex. Les neutrophiles retrouvés dans le BAL des animaux traités aux billes de Sephadex ont été purifiés de la bande cellulaire supérieure du gradient de Percoll 65 % dont les cellules ont été redéposées sur un gradient continu de Percoll 50 %. Les neutrophiles (densité 1.076 g/ml) ont été récupérés dans la bande inférieure de ce gradient de Percoll 50 %. Les neutrophiles ont été lavés deux fois avec 30 ml de PBS et resuspendus dans ce même tampon.

### **2.3.3 Les macrophages alvéolaires**

Les macrophages alvéolaires correspondent à 90 % de la population cellulaire alvéolaire chez le cobaye sain. Les macrophages ont été purifiés sur un gradient de Percoll 50 % après un BAL. Ces cellules ont été



collectées dans la bande supérieure du gradient de Percoll. Les macrophages alvéolaires ont été lavés deux fois avec 30 ml de PBS et resuspendus dans ce même tampon.

### **2.3.4 Les lymphocytes spléniques**

Afin d'obtenir un nombre significatif de lymphocytes et de monocytes, les lymphocytes spléniques ont été purifiées à partir de rate de cobayes témoins. Après dissociation du tissu splénique, les cellules totales ont été centrifugées et un choc osmotique a été réalisé afin d'éliminer les érythrocytes. Après centrifugation des cellules, le culot de cellules spléniques a été resuspendu dans 100 ml de milieu culture RPMI 1640 (10 % FBS, 2g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 80 U/ml de pénicilline G et 100 g/ml de streptomycine). Les cellules ont ensuite été déposées dans des boîtes de Pétri 100 mm x 20 mm (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) puis incubées pendant deux heures dans un incubateur (37 °C, 95 %  $\text{O}_2$  et 5 %  $\text{CO}_2$ ). Cette opération permet d'éliminer les monocytes par adhérence de ces cellules dans le fond de la boîte de Pétri. Le surnageant riche en lymphocytes a été récupéré, centrifugé pendant 10 min. à 600 x g et le culot est resuspendu dans 12 ml de milieu de culture RPMI 1640.

Les lymphocytes spléniques ont été purifiés sur NycoPrep™ 1.077 Animal (Cedarlane, Hornby, Ont.). Le NycoPrep™ est une solution de composé de 14.1 % (p/v) de Nycodenz N.N' -Bis (2,3-dihydroxypropyl) - 5 - [N-(2,3 - dihydroxypropyl) acetamino] - 2,4,6 - triodo - isophtalamide, 0.30 % (p/v) de NaCl et 5 mM de Tricine/NaOH pH 7.2. Ce produit a une densité de 1.077 g/ml et une osmolarité de 265 mOsm.

RICKWOOD et coll. (1982) et BØYUM (1976) ont utilisé ce composé pour purifier des lymphocytes. La suspension cellulaire enrichie en lymphocytes spléniques (6 ml) a été déposée sur 3 ml de NycoPrep™ puis centrifugée pendant 15 min à 600 x g. A l'aide d'une pipette Pasteur, les lymphocytes ont été récoltés dans une bande à l'interface entre le milieu de culture et la solution de NycoPrep™. Les lymphocytes après lavage avec du PBS ont été resuspendus dans ce même tampon. La viabilité cellulaire et la pureté en lymphocytes spléniques était de 92 et 93 % respectivement.

### **2.3.5 Les monocytes spléniques**

Les monocytes adhérents au fond des boîtes de pétris ont été récoltés mécaniquement à l'aide d'un policeman stérile. Les cellules ainsi recueillies ont été resuspendues dans du milieu de culture RPMI 1640, lavées et centrifugées (10 min. à 800 x g). Le culot cellulaire a été resuspendu dans 10 ml de milieu de culture.

Les monocytes spléniques ont été purifiés sur PolymorphPrep™ (Cedarlane, Hornby, Ont.). Le PolymorphPrep™ est une solution composée de 13.8 % (p/v) de métrizolate de sodium, 8 % de Dextran 500 avec une densité de 1.113 g/ml et une osmolarité de 460 mOsm (BØYUM, 1964; FERRANTE et THONG, 1980)

Brièvement, les monocytes ont été déposés (3.5 à 5 ml de suspension cellulaire) sur 3.5 ml de PolymorphPrep™ dans des tubes de 10 à 12 ml. Les tubes ont été centrifugés pendant 30 à 35 min. à 400-500 x g. A l'aide

d'une pipette Pasteur, les monocytes ont été récoltés dans une bande correspondant aux cellules mononucléaires. Puis, les cellules ont été lavées deux fois dans 3 ml de PBS et resuspendues dans ce même tampon. La viabilité et la pureté des monocytes spléniques était de 92 à 96 % respectivement.

## **2.4 COLORATIONS DES CELLULES KURLOFF**

Les colorations P.A.S. et Papanicolaou ont été utilisées afin d'identifier les cellules Kurloff et d'évaluer le contenu et la taille du corps d'inclusion.

### **2.4.1 La coloration au P.A.S.**

La coloration P.A.S. (Periodic Acid Schiff) permet la reconnaissance des structures cellulaires contenant des mucoprotéines en les colorant en rose. La préparation cellulaire (cytospin) de cellules Kurloff a été chauffée pendant 10 min. à 70 °C dans une solution d'acide périodique 3 % (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, N.J.). Les lames ont subi deux lavages successifs de 10 min. sous eau courante et eau distillée. Après séchage, les lames ont été placées dans le réactif de Schiff (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, N.J.) à la température ambiante et à l'abri de la lumière pour une période de 40 min. Le tout a été relavé pendant 15 min. sous eau courante. Cette coloration met en évidence le corps d'inclusion.



### 2.4.2 La coloration au réactif de Papanicolaou

Tel que décrit par PAPANICOLAOU (1942), la préparation cellulaire de cellules Kurloff (cytospin) est exposée à une série de bains contenant divers solvants et trois colorants principaux. Ces colorants sont: l'hématoxyline, l'OG-6 et l'EA-36 (Sigma Co. Chemical, St-Louis, MO). Cette coloration met en évidence le noyau et l'inclusion cytoplasmique des cellules Kurloff.

## 2.5 PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les anticorps monoclonaux (Acm) ont été produits selon la méthode décrite par KÖHLER et MILSTEIN (1975). Elle est basée sur la fusion membranaire entre un plasmocyte et une cellule myélomateuse de la même espèce animale. Les cellules hybrides (hybridomes) obtenues conservent leur capacité de sécréter des anticorps et leur propriété tumorale (prolifération indéfinie en culture). Ceci assure la production illimitée d'anticorps monoclonaux (Acm) avec une spécificité donnée. (voir figure 2)

Dans un premier temps, des souris BALB/c ont été sensibilisées à l'antigène (la cellule Kurloff) tel que décrit dans la section 2.1. A la fin de la période de sensibilisation, les splénocytes murins isolés ( $\sim 100 \times 10^6$  cellules) contenant les plasmocytes ont été fusionnés avec la lignée de myélomes NSO ( $10 \times 10^6$  cellules/ml) en présence de polyéthylène glycol (PEG) (Sigma Co. Chemical, St-Louis, MO) sous agitation dans du milieu RPMI 1640 (GALFRE et coll., 1977). Brièvement, après lavage des



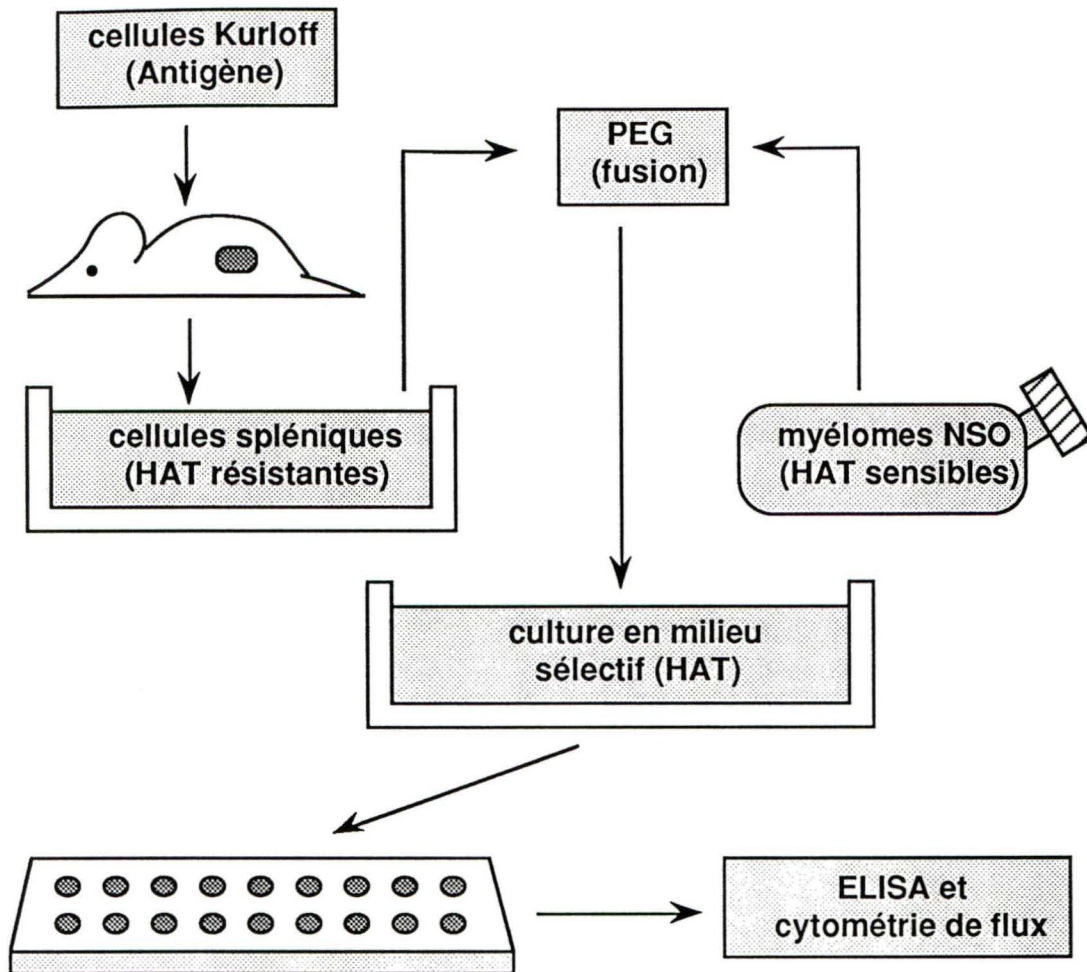


Figure 2: **Production d'anticorps monoclonaux (Acm).** Les Acm ont été produits selon la méthode décrite par KÖHLER et MILSTEIN (1975). La souris BALB/c a été sensibilisée à l'antigène (cellules Kurloff) de manière répétitive pendant plusieurs semaines. Les cellules spléniques de la souris (contenant beaucoup de plasmocytes) ont été fusionnées avec des myélomes NSO de la même espèce en présence de polyéthylène glycol. Les cellules ont été cultivées dans du milieu de culture sélectif HAT (hypoxanthine, aminoptérine et thymidine) favorisant uniquement la croissance des hybridomes. Les clones sécréteurs d'anticorps monoclonaux spécifiques des cellules Kurloff ont été identifiés par ELISA et par cytométrie de flux.

splénocytes murins et des myélomes NSO, les suspensions cellulaires ont été combinées et centrifugées à 800 x g pendant 5 min. La fusion membranaire a débuté avec l'ajout périodique de la solution de PEG 50 % sous agitation pendant 1 min. avec une pipette de 1 ml. Toujours sous agitation, 10 ml de RPMI 1640 (37 °C) ont été ajoutés sur une période de 10 min. La suspension cellulaire a été centrifugée 5 min. à 400 x g et le culot d'hybridomes a été suspendue dans 200 ml du milieu de culture sélectif (RPMI 1640 supplémenté avec 20 % de FBS, 2g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 80 U/ml de pénicilline G, 100 g/ml de streptomycine, 1X OPI, 1X HAT). Généralement, une moyenne de 500 à 1000 colonies d'hybridomes sont formées après ce traitement (HARLOW et LANE, 1988).

En 1964, Littlefield a mis en évidence la présence *in vitro* d'hybridomes grâce à un milieu de culture sélectif. Ce milieu de culture contient de l'hypoxanthine (H), de l'aminoptérine (A) et de la thymidine (T) et agit en bloquant la voie métabolique principale de la synthèse du nucléotide guanosine triphosphate (GTP). L'aminoptérine est un antagoniste de l'acide folique. Dans ces conditions, la cellule normale synthétise son propre GTP en utilisant une autre voie métabolique alternative de la synthèse des nucléotides. Ce sentier de secours est réalisé par l'action de deux enzymes; l'hypoxanthine guanine phosphoryl transférase et la thymidine kinase (HPGRT et TK). Cependant, les cellules NSO utilisées pour la fusion membranaire ne possède pas de HPGRT. Les myélomes non fusionnés vont mourir par faute de GTP et les splénocytes non fusionnés vont éventuellement mourir (culture primaire). Le supplément OPI contenu dans le milieu de culture des hybridomes contient de l'oxaloacétate (15 mg/100 ml de milieu de culture),

du pyruvate de sodium (5 mg/100 ml) et de l'insuline (20 UI/100 ml) qui stimulent la croissance cellulaire *in vitro* des hybridomes.

La suspension de cellules hybrides a été déposée dans des plaques de 96 puits à fonds plats en raison de 100 µl/puits dans des puits contenant des cellules nouricières (cellules spléniques provenant d'une souris BALB/c non sensibilisée à l'antigène) à une concentration de  $10 \times 10^6$  cellules/ml de RPMI 1640, 10 % FBS, 2g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 80 U/ml de pénicilline G et 100 g/ml de streptomycine. Les cellules nouricières sont présentes au début de la culture cellulaire afin de créer un environnement propice à la croissance cellulaire des hybridomes. Les plaques ont été incubées dans une atmosphère humidifiée (37 °C, 95 % O<sub>2</sub> et 5 % CO<sub>2</sub>). Les colonies de d'hybridomes (clones) n'apparaissent qu'environ une semaine après la fusion. Pour ces clones en croissance, des aliquotes de 100 µl de surnageant de milieu de culture ont été conservés à -20 °C afin de déterminer la spécificité des Acm sécrétés par ELISA.

Les clones produisant des Acm spécifiques contre les cellules Kurloff ont été mis en culture dans des plaques de 24 puits puis dans des flacons de 25 et 250 cm<sup>2</sup> (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA). Durant ces diverses mise en culture, le HAT est progressivement éliminé du milieu de culture utilisé initialement lors de la mise en culture des hybridomes. De plus, une partie de ces clones ont été congelés dans de l'azote liquide et les surnageants de milieu de culture (contenant les Acm) ont été congelés à -20 °C pour les expériences d'ELISA et de cytométrie de flux



## 2.6 CARACTÉRISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Différentes méthodes basées sur le principe de marquage indirect à l'aide d'un anticorps secondaire anti-souris ont été utilisées afin de déterminer la spécificité, l'isotype et les autres caractéristiques des anticorps monoclonaux (Acm).

### 2.6.1 TESTS ELISA

Le protocole d'ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) est une modification de celui décrit par FEIT et coll. (1983) et par BISHOP et HWANG (1992).

Dans un premier temps, les divers types cellulaires purifiés (ex.: cellules Kurloff, macrophages, éosinophiles...) ont été fixés avec de la glutaraldéhyde (Sigma Co. Chemical, St-Louis, MO) dans des plaques ELISA de 96 puits à fond plat en chlorure de polyvinyle (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA). Brièvement, les cellules ont été lavées 2 ou 3 fois avec 10 ml de PBS, centrifugées 5 min. à 400 x g et ajustées à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml. Cent microlitres de cette suspension cellulaire ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été ensuite centrifugées pendant 10 min à 420 x g. Une solution de glutaraldéhyde 0.5 % dans du PBS a été ajoutée aux plaques (100  $\mu$ l/puits) pour une incubation de 30 min. à 20 °C. La glutaraldéhyde permet la fixation des cellules dans le fond des plaques tout en conservant les structures membranaires de la cellule intactes. Après le temps d'incubation, la solution de glutaraldéhyde a été enlevée et les plaques ont été lavées deux fois avec du PBS. Une

solution PBS contenant 1 % de BSA (grade RIA) et 0.1 % d'azoture de sodium a été ajouté afin de bloquer respectivement les sites de liaisons non-spécifiques et empêcher toutes contaminations bactériennes. Les plaques ont été conservées à 4 °C dans un contenant humide et hermétiquement fermé.

Avant de mesurer la spécificité des Acm, les plaques ont été lavées 3 à 4 fois avec du PBS afin d'éliminer l'azoture de sodium. Une solution de PBS contenant 1 % de BSA (qualité RIA) a été ajoutée dans tous les puits (100 µl) pour à nouveau saturer les sites de liaisons non-spécifiques. Afin de déterminer la spécificité des Acm, le surnageant des hybridomes en culture (25 µl) a été déposé dans des puits contenant les cellules fixées à la glutaraldéhyde (cellules Kurloff ou un autre type cellulaire). Les plaques ont été incubées 1 h 30 min. à 20 °C puis lavées 3 à 4 fois avec du PBS à intervalle de 5 min. La présence d'Acm liés aux cellules a été révélée par un deuxième anticorps. Il s'agit d'un anticorps de chèvre anti-IgM et IgG de souris couplé à la peroxydase (Cedarlane, Hornby, Ont.) dilué 1:4000 dans du PBS 0.1 % BSA. Les plaques ont été incubées pour une autre période de 1 h 30 min. à 20 °C. Après lavage avec du PBS, la présence des Acm liés aux cellules a été révélée par densitométrie à l'aide du substrat chromogénique OPD (pastilles de 20 mg de dihydrochlorydrate de *o*-phénylènediamine) (Sigma Co. Chemical, St-Louis, MO) et 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, N.J.) dilué dans 10 ml de tampon citrate à pH 5.0. Cette solution chromogénique a été ajoutée dans les plaques (100 µl/puits) et incubée pendant 30 min. à l'abri de la lumière. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 25 µl/puits d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 N. La densité optique a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre Titertek

Multiscan®MC (Flow Laboratories, Mississauga, Ont.) à une longueur d'onde de 490 nm. Le milieu de culture standard ainsi que le surnageant du myélome NSO et d'un anticorps non spécifique ont servi de témoins.

Lors de la détermination des meilleurs clones producteurs d'Acm, les surnageants de milieu de culture ont été dilués (1:4 à 1:1000) afin de déterminer le titre des Acm.

### **2.6.2 Cytométrie de flux**

Pour les expériences de cytométrie de flux, les divers types cellulaires purifiés (ex.: cellules Kurloff, macrophages, éosinophiles...) ont été ajustés à une concentration de  $10 \times 10^6$  cellules/ml et des aliquotes de 50 µl de la suspension cellulaire ont été distribuées dans des tubes #2058 de Falcon (Falcon, Oxnard, CA). Un volume égal de surnageant est ajouté dans chaque tube. Les cellules ont été incubées avec le surnageant des anticorps primaires pendant 45 min. à 4 °C. Après lavage et centrifugation des plaques, l'anticorps secondaire de mouton anti-IgG de souris marqué à la fluorescéine (Cedarlane, Hornby, Ont.) (dilué au 1/200 dans du RPMI 1640) a été incubé avec les cellules pour une autre période de 45 min. Après un deuxième lavage, les culots cellulaires ont été resuspendus dans 100 µl de PBS et le pourcentage de cellules positives a été obtenu à l'aide d'un appareil FACScan (Becton Dickinson Canada Inc., Mississauga, Ont.). Comme dans les essais ELISA, le milieu de culture standard ainsi que le surnageant du myélome NSO et d'un anticorps non spécifique ont servi de témoins.



Lors de la détermination du marquage des Acm au niveau des sous-populations de cellules Kurloff, une dilution 1:2 (pour les Acm 14D1, 20F4 et 21G11) ou 1:10 (pour les Acm 1A5, 6B9, 9F11, 16H6 et 21E12) des Acm a été utilisée. Ceci correspond à la dernière dilution donnant un marquage maximal (par cytométrie de flux) contre les cellules Kurloff. Cette dilution a été utilisée afin d'éviter une sursaturation des épitopes à la surface des sous-populations de cellules Kurloff. Pour ce qui est de la détermination du marquage des Acm anti-CD16h et anti-CD56h (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) au niveau des sous-populations de cellules Kurloff, une aliquote de 10  $\mu$ l d'Acm commercial a été ajouté à chaque suspension (50  $\mu$ l) de cellules Kurloff.

### **2.6.3 Détermination de l'isotype des anticorps monoclonaux**

La détermination de l'isotype des Acm a été réalisée à l'aide de bandelettes de nitrocellulose fixées à un support inerte sur lequel les Acm vont se fixer (Sigma Co. Immunochemicals, St-Louis, MO). L'isotype des Acm a été identifié par le système enzymatique biotine-avidine tel que décrit dans le manuel d'utilisation de la trousse. Un témoin positif a été incorporé dans chacun des essais qui sert de contrôle de qualité interne. Ce système a une sensibilité de 1  $\mu$ g/ml d'Acm murin sous forme de surnageant de milieu de culture et ne requiert qu'un petit volume de ce surnageant (2 ml). Brièvement, cet essai s'effectue dans des tubes de 12 x 75 mm et consiste en une série d'incubations et de lavages avec un premier anticorps (Acm) et un deuxième anticorps biotinylé qui seront révélés par un substrat chromogène et par l'enzyme peroxydase.

#### 2.6.4 Immunofluorescence

Des cytopins de cellules Kurloff ( $0.10 \times 10^6$  cellules/cytospine) provenant de cobayes témoins et de cobayes traités aux œstrogènes ont été fixées pendant 60 min. avec une solution PBS contenant 2 % de paraformaldéhyde à 4 °C. Après lavage des lames, les sites non spécifiques ont été bloqués par incubation avec une solution PBS contenant 1 mM de glycine pendant 45 min. à 4 °C. Après un autre lavage, les cellules ont été incubées avec une dilution 1:10 (PBS - 1 % BSA) des Acm anti-cellules Kurloff (9F11, 14D1, 16H6 ou 20F4) ou de l'anticorps non-spécifique pendant 1 heure à la température de la pièce. Dans les mêmes conditions, les cellules Kurloff ont été incubées en présence du deuxième anticorps (dilué 1:50) anti-IgG de souris marqué à la fluorescéine isothiocyanate (Sigma Co. Immunochemicals, St-Louis, MO). La préparation des lames à la photographie a été réalisée avec une solution 90 % glycine - 10 % PBS dans laquelle a été dilué 1 mg/ml d'o-phénylènediamine. La mesure de la fluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope Diaplan (Leitz, Postfach, Allemagne) au Département d'hématologie clinique du C.H.U.S.

#### 2.6.5 ImmunoGold

Les cellules Kurloff provenant de cobayes témoins et traités aux œstrogènes ont été ajustées à une concentration de  $1 \times 10^8$  cellules/ml. La préparation des échantillons a été effectuée selon la méthode décrite par HELINSKI et coll. (1990). Brièvement, 50 µl d'un échantillon cellulaire ( $1 \times 10^8$  cellules/ml) ont été déposés sur une lamelle de 12 mm de diamètre, d'épaisseur No. 1 (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA) préalablement

traitée à la poly-L-lysine (MAZIA et coll., 1975). Les cellules ont été fixées pendant 10 min. à l'aide d'un tampon HEPES (0.2 M; pH 7.2) contenant 0.1 % de glutaraldéhyde (qualité EM) et 4.5 % de sucrose dissous dans de l'eau déionisée. Les sites non-spécifiques ont été bloqués par deux incubations de 5 min dans une solution de PBS contenant 1 % de sérum humain inactivé et 1 % de BSA. Les lames ont été incubées pendant 1 heure en présence du premier anticorps (50 à 100  $\mu$ l) dans un incubateur à atmosphère humidifiée. L'excès de premier anticorps a été éliminé par des lavages dans du PBS. Les cellules lavées ont été incubées avec 50  $\mu$ l du deuxième anticorps anti-IgG de souris couplé à des billes d'or de 30 nm (Cedarlane, Hornby, Ont.) dilué 1:10 dans une solution de PBS contenant 1 % de sérum humain inactivé et 1 % de BSA. Les cellules ont été incubées à nouveau pendant 1 heure à 37 °C dans une atmosphère humidifiée. Les lamelles ont été ensuite lavées pendant 15 min dans 8 ml de PBS, pour enfin être conservées dans un tampon HEPES (0.2 M; pH 7.2) contenant 2.5 % de glutaraldéhyde. Avant l'observation des échantillons à l'aide d'un microscope électronique à balayage JEOL JSM #840A en mode électron rétrodiffusé, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS et déshydratées en utilisant des concentrations croissantes d'éthanol et séchées par la méthode de séchage par point critique.

## 2.7 ESSAIS DE CYTOXICITÉ

Nous avons utilisé la technique de relâchement spécifique de chrome radioactif afin d'étudier l'activité NK parmi les sous-populations de cellules Kurloff. L'effet de l'anticorps 14D1 sur l'activité NK des cellules Kurloff a aussi été étudié selon la même méthode.



### 2.7.1 Cellule cible tumorale

La cellule cible de lignée murine YAC-1 a été utilisée pour les essais de cytotoxicité *in vitro*. Les cellules YAC-1 provenant d'un lymphome induit par le virus Maloney chez la souris A/Sn, est sensible à l'activité NK. Ces cellules sont non-adhérentes et ont été cultivées dans du milieu de culture RPMI 1640 supplémenté avec du FBS 10% et des antibiotiques dans des flacons de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, CA) à 37 °C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cultures de cellules YAC-1 sont diluées 1:10 deux à trois fois par semaine.

### 2.7.2 Marquage de la cellule cible

Les cellules YAC-1 en phase exponentielle de croissance ont été resuspendues dans 1 ml de RPMI 1640 en présence de 200 µCi de Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (Amersham, Cambridge, MA) et incubées à 37 °C pendant 2 heures sous une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules marquées ont été lavées 2 fois dans 10 ml de PBS puis centrifugées (5 min., 400 x g). Les cellules ont été ajustées à une concentration de 5 x 10<sup>4</sup> cellules/ml immédiatement avant l'expérience.

### 2.7.3 Cytotoxicité des sous-populations

Pour mesurer l'activité cytotoxique des sous-populations de cellules Kurloff, nous avons utilisé l'essai de relâchement de <sup>51</sup>Cr tel que décrit par DEBOUT et coll. (1984). Les sous-populations de cellules Kurloff (5 x 10<sup>6</sup>

cellules/ml) ont été distribuées en triplicata (100 µl/puits) dans des microplaques à fond plat de 96 puits (Costar, Cambridge, MA). Elles ont été ensuite diluées successivement afin de donner 5 ratios final de cellules effectrices : cellules cibles soit; 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 et 6.25:1. Cent microlitres de cellules cibles ( $5 \times 10^3$  cellules YAC-1/puits) ont été ajoutés et chaque puits a été complété à 300 µl par l'ajout de 100 µl de milieu standard. Les plaques de 96 puits ont ensuite été centrifugées pendant 5 min à 150 x g puis incubées à 37 °C pendant 4 heures sous une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Après centrifugation des plaques, 150 µl de surnageant ont été recueillis afin de mesurer le <sup>51</sup>Cr relâché par les cellules YAC-1 à l'aide d'un compteur gamma (Beckman Gamma 5500). Le pourcentage de cytotoxicité est calculé selon la formule:

$$\frac{RE - RS}{RT - RS} \times 100 = \text{cytotoxicité (\%)}$$

où RE représente le relâchement de <sup>51</sup>Cr (en cpm) par les cellules YAC-1 en présence de cellules Kurloff, RS représente le relâchement spontané de <sup>51</sup>Cr par les YAC-1 en absence des cellules Kurloff et RT représente la radioactivité totale mesurée sur 100 µl des cellules cibles marquées (variant entre 1 500 et 3 000 cpm). Le relâchement spontané (RS) représentait approximativement 15 à 20 % du relâchement totale. Ensuite, les pourcentages de cytotoxicité obtenus pour les cinq ratios de cellules cibles : cellules effectrices ont été transformés en unités lytiques à l'aide d'un logiciel conçu par PROSS et coll. (1981).

#### **2.7.4 Effet de l'anticorps monoclonal 14D1 sur l'activité NK**

L'effet de l'anticorps monoclonal sécrété par le clone 14D1 sur l'activité cytotoxique des cellules Kurloff a été évalué de la même façon que dans la section précédente. Cependant, nous avons utilisé une population mixte de cellules Kurloff correspondant à la bande inférieure d'un gradient de Percoll de 50 % (1.076 à 1.100 g/ml). Dans cette série d'expériences, le surnageant du clone 14D1, le surnageant du myélome NSO ou le surnageant d'un Acm murin de même isotype que l'Acm produit par le clone 14D1 ont été ajoutés dans les puits contenant des cellules YAC-1. Les valeurs du relâchement spontané (RS) n'étaient pas affectés par les surnageants ajoutés. Le surnageant du myélome NSO et de l'Acm murin non-spécifique ont été utilisés comme témoins.

### **2.8 ANALYSES STATISTIQUES**

La significativité des différences entre les résultats a été déterminée par le test T de Student pour données paires et par analyse de variance. Les valeurs dont le coefficient de probabilité était de  $p < 0.05$  ont été considérées significatives. Pour les résultats, les valeurs de  $p < 0.05$  et de  $p < 0.01$  sont indiquées par un ou de deux astérisques, respectivement.



## **RÉSULTATS**

### 3.1 NOMBRE DE CELLULES KURLOFF DANS LE SANG

Le nombre de cellules Kurloff sanguines retrouvées chez les cobayes femelles traitées aux œstrogènes a été mesuré au cours du traitement. Les cobayes ont été traités pendant 1, 2, 3 et 4 à 6 semaines avant d'être sacrifiés pour les comptes cellulaires. Les résultats présentés à la figure 3 indiquent qu'il y a  $36.0 \pm 8.0$  cellules Kurloff/mm<sup>3</sup> de sang chez les cobayes témoins et que le nombre maximal de cellules Kurloff ( $85.0 \pm 18.9$  cellules Kurloff/mm<sup>3</sup>) est atteint après la deuxième semaine du traitement aux œstrogènes. Cependant, le nombre de cellules Kurloff dans le sang semble diminuer ( $35.3 \pm 7.8$  cellules Kurloff/mm<sup>3</sup>) lorsque ce traitement est prolongé au-delà de trois semaines.

### 3.2 NOMBRE DE CELLULES KURLOFF DANS LA MOËLLE OSSEUSE

Le nombre de cellules Kurloff contenue dans la moëlle osseuse a été évalué en isolant les cellules de la moëlle osseuse du fémur droit et gauche pour les mêmes périodes de traitement hormonal tel que décrit dans la section précédente. Les résultats présentés à la figure 4 montrent que le traitement aux œstrogènes induit de manière importante (~2 fois) le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la moëlle osseuse. Ce nombre étant maximum entre 4 et 6 semaines après le début du traitement. Le nombre de cellules Kurloff comptées chez les cobayes témoins est de  $1.62 \pm 0.32$  cellules Kurloff/fémur ( $\times 10^6$ ) et est de  $1.08 \pm 0.08$ ,  $5.68 \pm 0.40$ ,  $6.44 \pm 0.74$  et  $9.60 \pm 1.29$  cellules Kurloff/fémur ( $\times 10^6$ ) après 1, 2, 3 et 4 à 6 semaines de traitement hormonal.

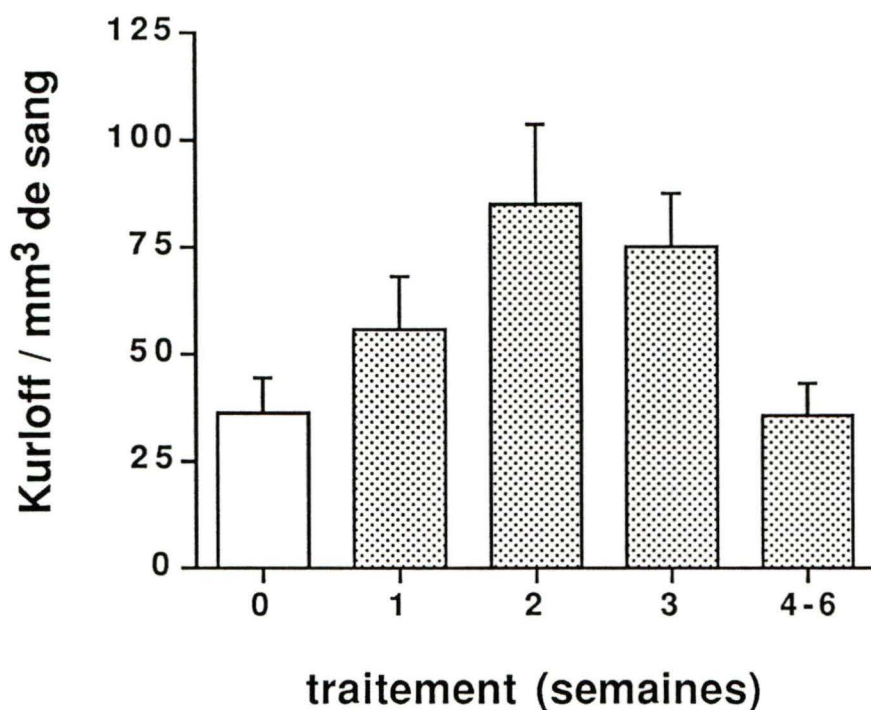


Figure 3: **Effet de l'œstradiol sur le nombre de cellules Kurloff dans le sang.** Des cobayes femelles Dunkin-Hartley (250 - 300 g) ont reçu plusieurs injections intra péritonéales de 17- $\beta$ -3-benzoate œstradiol à une dose de 3 mg/Kg de poids corporel/semaine. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps après le traitement hormonal. Le sang a été obtenu par ponction cardiaque et les leucocytes sanguins ont été purifiés sur gradient de Percoll 67.5 %. Le temps 0 correspond aux animaux témoins non-traités aux œstrogènes. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  écart-type de 3 expériences.



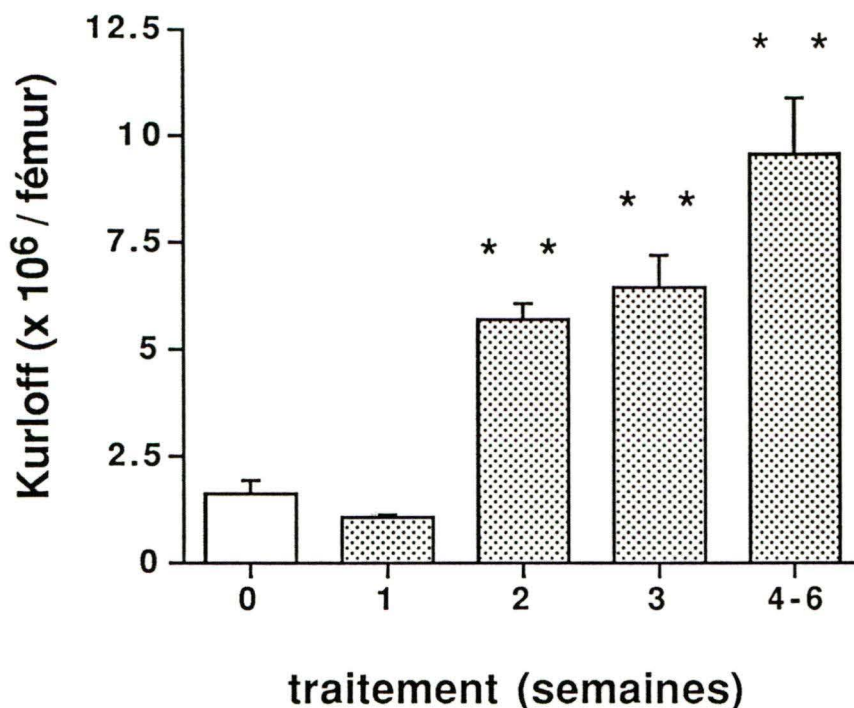


Figure 4: **Effet de l'œstradiol sur le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la moëlle osseuse.** Des cobayes femelles Dunkin-Hartley (250 - 300 g) ont reçu des injections intra péritonéales de 17- $\beta$ -3-benzoate œstradiol à une dose de 3 mg/Kg de poids corporel/semaine. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps après le traitement hormonal. La moëlle osseuse a été isolée du fémur gauche et droit de cobayes témoins et traités. Le nombre maximal de cellules Kurloff est atteint lorsque le traitement hormonal est prolongé de plus de quatre semaines. Le temps 0 correspond aux animaux témoins non-traités aux œstrogènes. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 expériences.

### 3.3 NOMBRE DE CELLULES KURLOFF DANS LA RATE

Les rates isolées de cobayes témoins contiennent un nombre assez faible de cellules Kurloff (environ 11 à 15 x 10<sup>6</sup> cellules/rate) Tel qu'illustré à la figure 1, les cellules Kurloff se retrouvent dans deux bandes après centrifugation sur gradient continu de Percoll 50 %. La bande du haut représente les populations cellulaires de plus faible densité (1.048 et 1.062 g/ml) et la bande du bas représente les populations de cellules Kurloff de plus forte densité (1.076, 1.087 et 1.100 g/ml).

À la figure 5, nous avons évalué l'augmentation du nombre de cellules Kurloff totales (1.048 à 1.100 g/ml), de faible et de forte densité après 1, 2, 3 et 4 à 6 semaines de traitement aux œstrogènes. Le nombre total de cellules Kurloff spléniques chez les cobayes témoins est de  $12.99 \pm 1.89$  cellules Kurloff/rate (x 10<sup>6</sup>) et pour chacun des intervalles du traitement hormonal mentionné plus haut, nous avons purifié  $16.80 \pm 3.30$ ,  $64.07 \pm 10.98$ ,  $160.82 \pm 14.70$  et  $118.72 \pm 14.97$  cellules Kurloff/rate (x 10<sup>6</sup>) respectivement. Le nombre de cellules Kurloff spléniques est maximal après la troisième semaine du traitement (figure 5).

Chez les populations de plus faibles densité (1.048 et 1.062 g/ml), nous avons compté  $6.27 \pm 0.54$  cellules Kurloff/rate (x 10<sup>6</sup>) pour les cobayes témoins et  $13.40 \pm 3.29$ ,  $42.83 \pm 10.98$ ,  $48.29 \pm 14.70$  et  $27.23 \pm 4.13$  cellules Kurloff/rate (x 10<sup>6</sup>) ont été purifiées pour chacune des semaines de traitement hormonal respectivement. Finalement, les populations de plus forte densité (1.076 à 1.100 g/ml) ont présenté une augmentation plus importante en cellules Kurloff. Nous avons compté  $6.72 \pm 1.89$  cellules

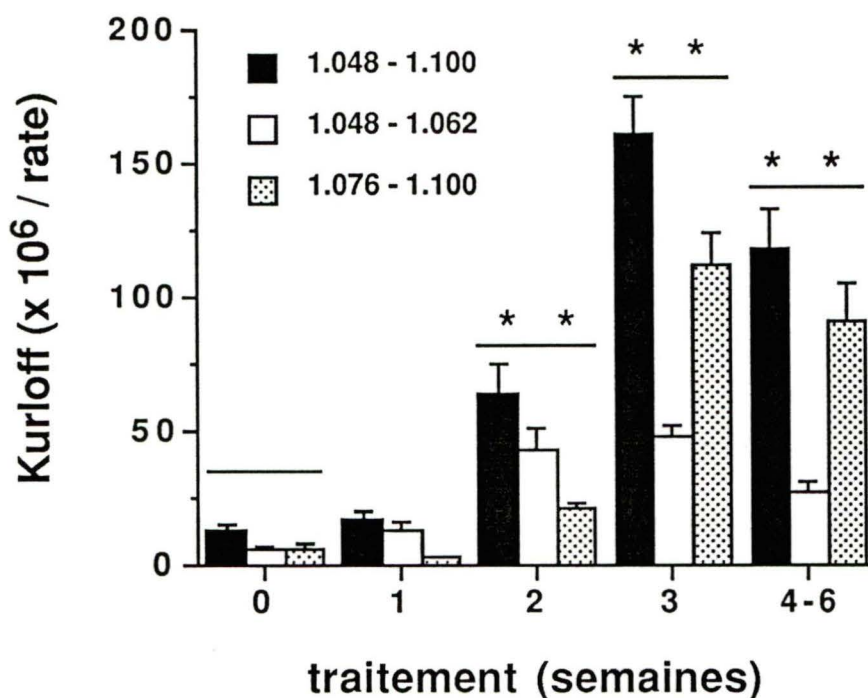


Figure 5: **Effet de l'œstradiol sur le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la rate.** Des cobayes femelles Dunkin-Hartley (250 - 300 g) ont reçu des injections intra péritonéales de 17- $\beta$ -3-benzoate œstradiol à une dose de 3 mg/Kg de poids corporel/semaine. Les animaux ont été sacrifiés à différents temps après le traitement hormonal. Le nombre de cellules Kurloff de faible (1.048 et 1.062 g/ml) et de forte densité (1.076 à 1.100 g/ml) ainsi que la somme totale de cellules Kurloff (1.048 à 1.100 g/ml) ont été mesuré dans la rate isolée chez des cobayes témoins (temps 0) et traités aux œstrogènes (temps 1, 2, 3 et 4 à 6 semaines). Les valeurs sont la moyennes  $\pm$  l'écart-type de 10 à 15 expériences.



Kurloff/rate ( $\times 10^6$ ) pour les cobayes témoins et  $3.40 \pm 0.20$ ,  $21.24 \pm 2.40$ ,  $112.53 \pm 11.95$  et  $91.49 \pm 13.53$  cellules Kurloff/rate ( $\times 10^6$ ) après 1, 2, 3 et 4 à 6 semaines de traitement hormonal. Les cellules Kurloff de faible densité sont en nombre plus important dans la rate 1 et 2 semaines après le traitement hormonal. Cependant, le nombre de cellules Kurloff de plus forte densité devient plus important trois semaines après le traitement aux œstrogènes. Le nombre de cellules Kurloff n'est pas augmenté, voir même diminue, quatre à six semaines après le traitement hormonal.

### **3.4 CORRÉLATION ENTRE LE NOMBRE DE CELLULES KURLOFF RETROUVÉS DANS LES DIVERS TISSUS ET ORGANES**

Le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la moëlle osseuse a été mis en corrélation au nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la rate et le sang à différents temps après le traitement aux œstrogènes, soit 0, 1, 2, 3 et 4 à 6 semaines (T0, T1, T2, T3, T4-6). Tel que présenté à la figure 6a, une étude de la corrélation indique qu'il existe une très bonne corrélation ( $r = 0.824$ ) entre l'augmentation du nombre de cellules Kurloff de la moëlle osseuse et spléniques. En ordonnée, nous observons le nombre de cellules Kurloff/fémur ( $\times 10^6$ ) soit,  $1.65 \pm 0.32$ ,  $1.08 \pm 0.08$ ,  $5.68 \pm 0.40$ ,  $6.44 \pm 0.74$  et  $9.60 \pm 1.29$  en fonction du nombre de cellules Kurloff spléniques ( $\times 10^6$ ) soit,  $12.99 \pm 1.39$ ,  $16.80 \pm 3.30$ ,  $64.07 \pm 10.98$ ,  $160.82 \pm 14.70$  et  $118.72 \pm 14.97$  pour chacun des temps du traitement hormonal. Cependant, à la figure 6b, nos résultats montrent que l'augmentation du nombre de cellules Kurloff de la moëlle osseuse n'est pas relié ( $r = 0.057$ ) au nombre de cellules Kurloff retrouvées au niveau du sang au cours du traitement aux œstrogènes (figure 6b). En ordonnée, nous observons le nombre de

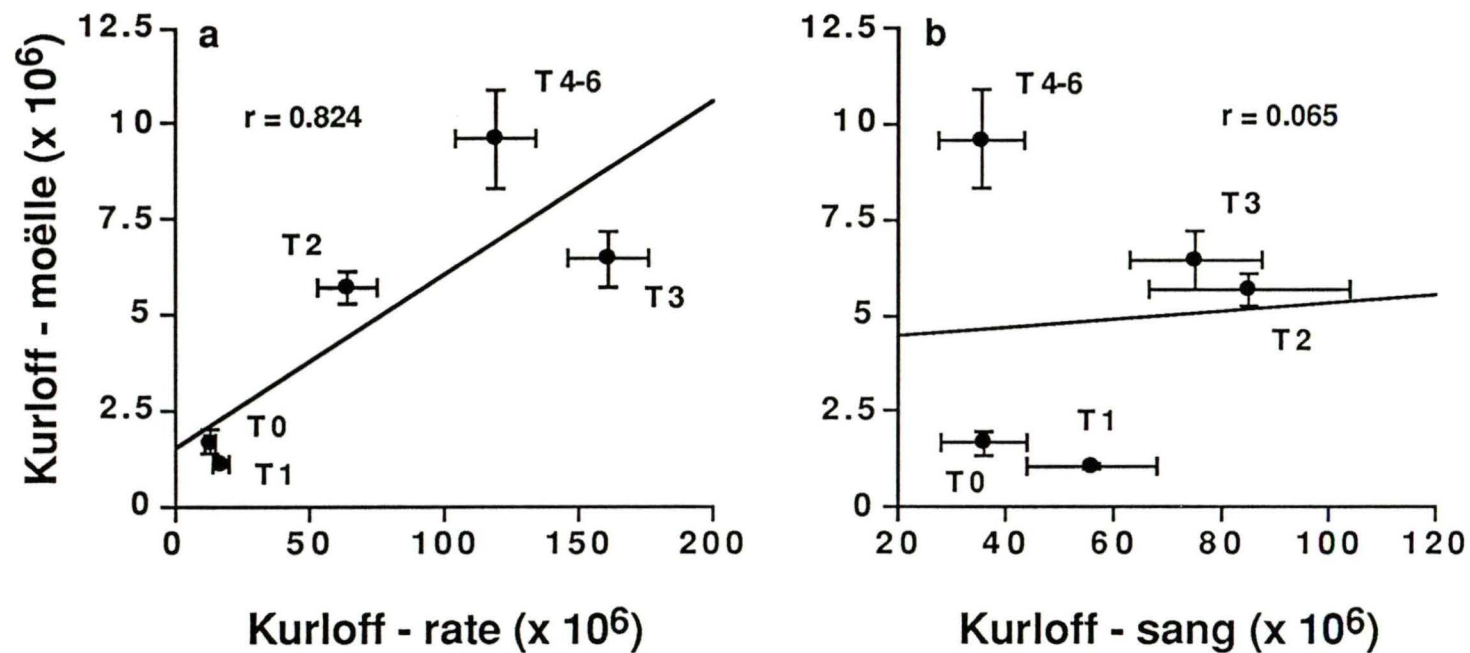


Figure 6: **Corrélations entre le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans la moëlle osseuse, la rate et le sang.**

L'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans la moëlle osseuse au cours du traitement à l'œstradiol est relié ( $r = 0.824$ ) à l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans la rate (6a). Cependant l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans la moëlle osseuse n'est pas relié ( $r = 0.065$ ) à l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans le sang au cours du même traitement (6b). Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 expériences.

T0: temps 0    T1, T2, T3 et T4-6: temps 1, 2, 3 et 4-6 semaines

cellules Kurloff/fémur ( $\times 10^6$ ) tel qu'énuméré plus haut en fonction du nombre de cellules Kurloff/mm<sup>3</sup> de sang soit,  $36.0 \pm 8.0$ ,  $55.7 \pm 12.0$ ,  $85 \pm 18.9$ ,  $75.0 \pm 12.30$  et  $35.3 \pm 7.8$  pour chacun des temps de traitement aux œstrogènes.

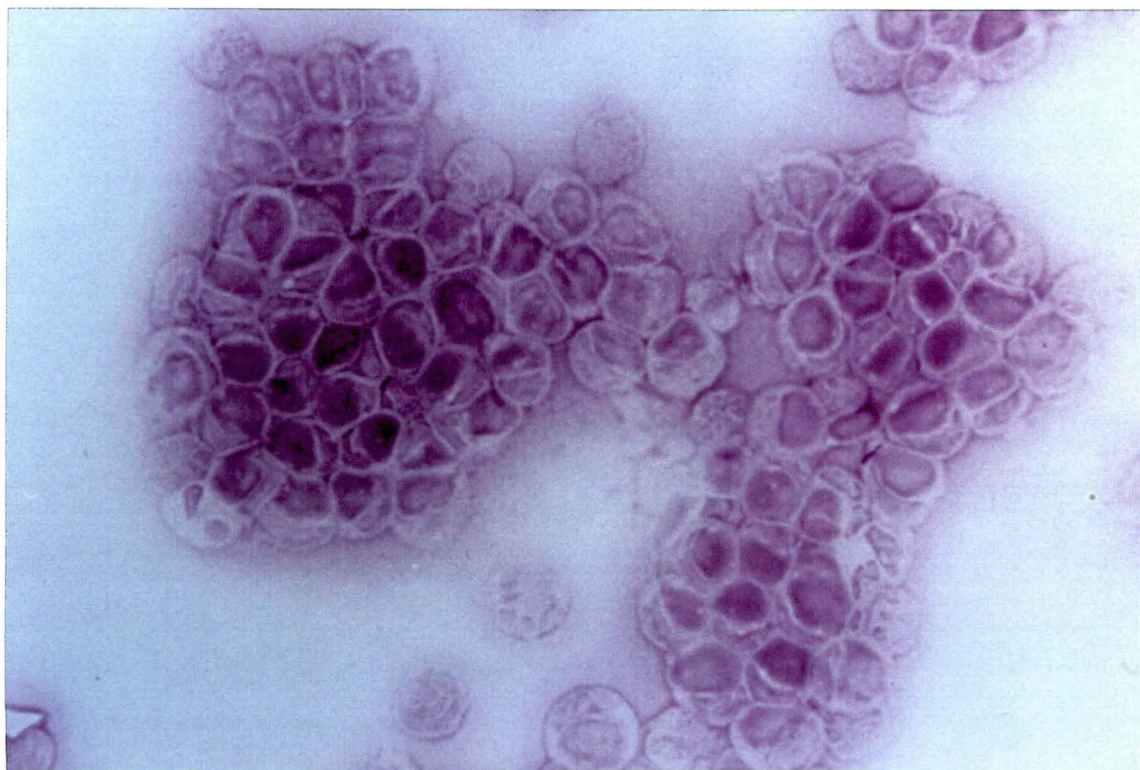
### **3.5 IDENTIFICATION DES CELLULES KURLOFF PAR LA COLORATION ACIDE PÉRIODIQUE SCHIFF**

L'inclusion cytoplasmique des cellules Kurloff contient des mucoprotéines qui colorent avec le réactif de Schiff (REVELL, 1977 pour revue). La coloration P.A.S. a été utilisée pour confirmer la présence de ces cellules dans notre préparation cellulaire de la rate. Les cellules purifiées provenant de la bande inférieure du gradient de Percoll 50 % et colorées au P.A.S. contiennent effectivement une inclusion cytoplasmique (contenant des mucoprotéines) de couleur rose foncé, typique de cette coloration (figure 7).

### **3.6 SÉLECTION DES CLONES PAR ELISA**

Notre premier critère de sélection était la production d'anticorps monoclonaux spécifiques des cellules Kurloff. Les surnageants de 1984 clones ont été testés par la technique d'ELISA contre des cellules Kurloff, des macrophages alvéolaires et des lymphocytes spléniques de cobaye. La figure 8 illustre un échantillonnage représentatif de 4 clones, sur 26 clones sélectionnés, qui sécrétaient des Acm anti-cellules Kurloff. La densité optique obtenue contre les cellules Kurloff pour chaque Acm est fixé à 100 % et le marquage obtenu contre les macrophages et contre les lymphocytes





**Figure 7: Coloration au P.A.S. des cellules Kurloff.** Les cellules Kurloff déposées sur une lame ( $0.1 \times 10^6$  cellules/cytospin) ont été colorées avec le P.A.S. (Periodic Acid Schiff). Cette coloration met en évidence les mucoprotéines contenues dans le corps d'inclusion des cellules Kurloff. On remarque la couleur rose foncé typique de la réaction de Schiff.

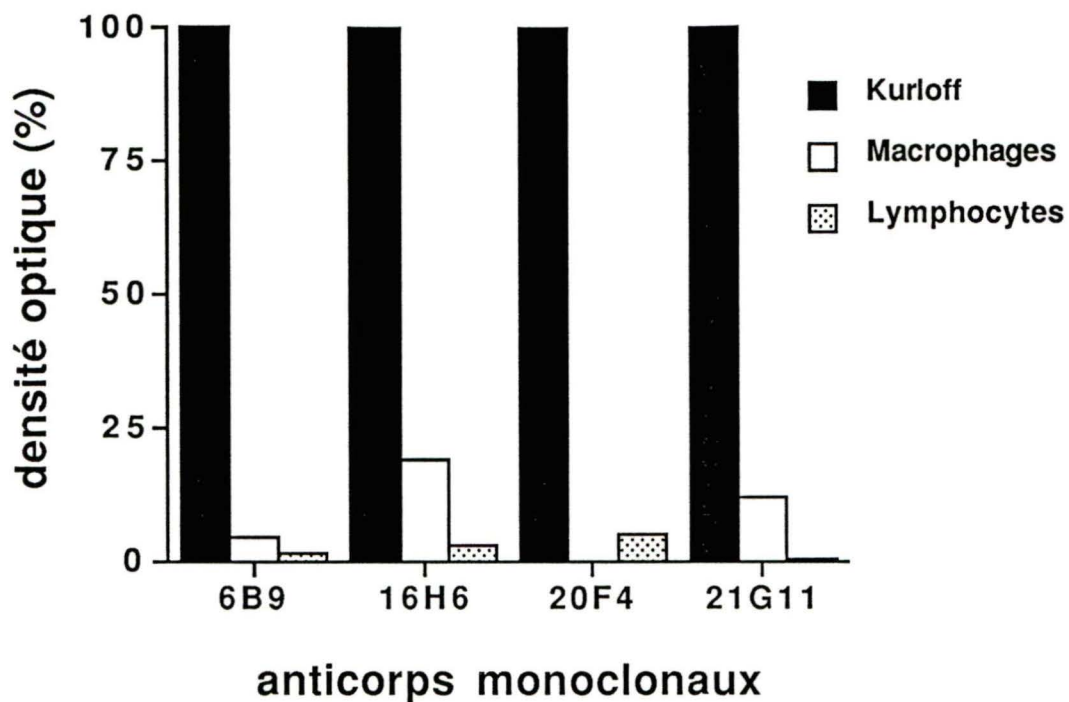


Figure 8: **Sélection des clones par ELISA.** Exemple représentatif de 4 clones sécrétant des Acm spécifiques des cellules Kurloff. Les surnageants de milieux de culture (25  $\mu$ l/puits) ont été incubés 30 min à 20 °C dans des plaques de 96-puits contenant des cellules Kurloff, des macrophages alvéolaires ou des lymphocytes spléniques ( $1 \times 10^5$  cellules/puits). La présence des Acm fixés aux cellules a été révélée par marquage indirect à l'aide d'un deuxième anticorps couplé à une peroxydase. La densité optique obtenue contre les cellules Kurloff est fixé à 100 % pour chaque Acm. Sur 1984 clones de départ, ce premier critère de sélection nous a permis d'identifier 26 clones sécréteurs d'Acm spécifiques des cellules Kurloff. Les valeurs sont la moyennes de 2 à 3 expériences.

est comparé à celui obtenu avec les cellules Kurloff. Les pourcentages de densité optique moyen obtenu contre les macrophages et les lymphocytes par les AcM sécrétés par les clones 6B9, 16H6, 20F4 et 21G11 sont les suivants: 4.4, 1.4; 18.9, 3.1; 0.0, 5.2 et 12.2, 0.6 % respectivement.

### **3.7 SÉLECTION DES CLONES PAR TITRAGE ELISA**

Notre autre critère de sélection était de mesurer la quantité d'AcM produit par les hybridomes. Pour ce faire, différentes dilutions (1:4 à 1:1000) des surnageants de milieu de culture (contenant les AcM) des 26 clones préalablement sélectionnés ont été réalisées. Brièvement, les différentes dilutions de surnageants d'AcM ont été incubées dans des plaques de 96 puits auxquelles étaient fixés des cellules Kurloff. La liaison des AcM aux cellules Kurloff a été révélée par densitométrie à l'aide d'un deuxième Ac couplé à une peroxydase. Le titre utilisé dans le tableau I est défini par la dilution du surnageant donnant un dixième de la densité optique maximale pour chacun des AcM donnés. Leurs titres varient de 1/8 à 1/1000. Nous avons décidé de garder les clones possédant un titre égal ou supérieur à 1/50. Sur la base de ce critère, nous avons sélectionné les 14 clones meilleurs producteurs d'AcM anti-cellules Kurloff (Tableau 1).

### **3.8 SÉLECTION DES CLONES PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX**

Le dernier critère de sélection était à nouveau un test de spécificité des AcM effectué par cytométrie de flux sur une gamme plus extensive de cellules immunocompétentes telles les éosinophiles, les neutrophiles et les macrophages alvéolaires de cobaye ainsi que des monocytes et des



TABLEAU I

## Sélection des clones par titrage (ELISA)

Acm	titre	Acm	titre	Acm	titre
1A5	1/1000	9G9	1/8	20C5	1/8
2G2	1/120	9H4	1/30	20E10	1/20
3A5	1/110	14C6	1/50	20F4	1/1000
6B9	1/900	14D1	1/50	20G2	1/1000
7A10	1/30	16D2	1/10	21A1	1/20
7H11	1/25	16G7	1/110	21C7	1/100
9A12	1/25	16G10	1/20	21E12	1/1000
9F11	1/1000	16H6	1/1000	21G11	1/120
9G3	1/8	20B1	1/8		

Acm: anticorps monoclonaux

titre: dilution d'Acm donnant 10 % de la densité optique maximale

lymphocytes spléniques. Le pourcentage de cellules positives est calculé par soustraction du marquage obtenu pour un Acm sur une cellule donnée et le marquage non-spécifique (anticorps non-spécifique) obtenu pour cette même cellule. La figure 9 illustre un échantillonnage représentatif de 4 clones (sur 8 sélectionnés) qui produisent les Acm les plus spécifiques dirigés contre les cellules Kurloff. Le pourcentage de cellules positives obtenus contre les cellules Kurloff, les monocytes, les éosinophiles, les lymphocytes et les neutrophiles pour les Acm sécrétés par les clones 1A5, 9F11, 14D1 et 21E12 sont les suivants:  $85.5 \pm 0.5$ ,  $18.7 \pm 2.4$ ,  $5.1 \pm 0.5$ ,  $0.9 \pm 0.4$  et  $0.0 \pm 0.5$ ;  $93.3 \pm 1.4$ ,  $4.7 \pm 0.6$ ,  $0.2 \pm 0.2$ ,  $1.3 \pm 0.4$  et  $0.0 \pm 0.0$ ;  $76.1 \pm 0.2$ ,  $13.3 \pm 1.5$ ,  $7.5 \pm 0.7$ ,  $5.3 \pm 0.7$  et  $12.0 \pm 1.0$ ;  $93.1 \pm 1.1$ ,  $15.5 \pm 1.8$ ,  $4.9 \pm 0.6$ ,  $2.2 \pm 0.2$  et  $0.0 \pm 0.0$  % de cellules positives respectivement. Aucune immunofluorescence n'a été obtenue contre les macrophages par la technique de cytométrie de flux. La faible immunofluorescence obtenue contre les différents types cellulaires immunocompétents de cobayes est considérée non-spécifique en comparaison avec l'immunofluorescence obtenue contre les cellules Kurloff.

### **3.9 DÉTERMINATION DE L'ISOTYPE DES ANTICORPS MONOCLONAUX**

A l'aide d'une trousse de détection des isotypes d'Acm, nous avons déterminé les isotypes des 8 Acm sélectionnés (1A5, 6B9, 9F11, 14D1, 16H6, 20F4, 21E12 et 21G11). L'isotype des Acm a été identifié par le système enzymatique biotine-avidine directement sur les bandelettes de nitrocellulose sur lesquelles les Acm étaient fixés. Les Acm produits par ces 8 hybridomes sont d'isotype IgG1 (résultats non illustrés).

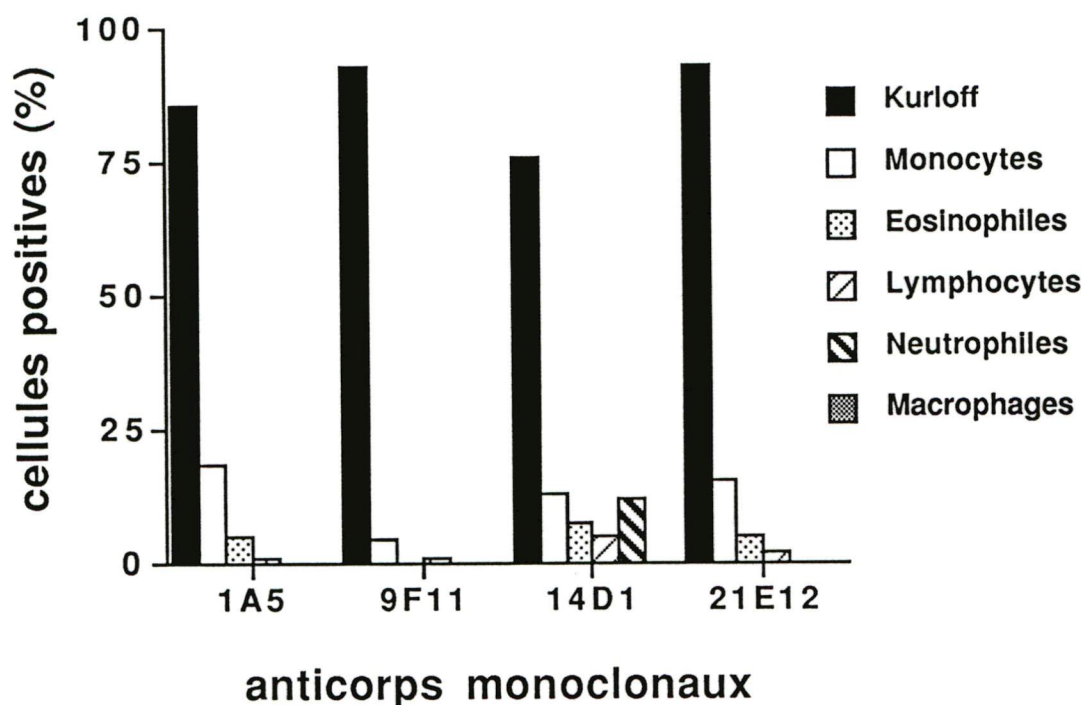


Figure 9: **Sélection des clones par cytométrie de flux.** Exemple représentatif de 4 clones sécrétant des Acm spécifiques dirigés contre des cellules Kurloff. Les surnageants de milieux de culture (50 ml/échantillon) ont été incubés 45 min à 4 °C dans des tubes contenant les cellules Kurloff ou d'autres cellules immuno-compétentes de cobaye ( $5 \times 10^5$  cellules/échantillon). La présence des Acm fixés aux cellules a été révélée par marquage indirect à l'aide d'un deuxième anticorps munis de la fluorescéine La fluorescence obtenu contre les cellules Kurloff a été comparée à celle obtenue pour les autres types cellulaires. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 expériences.



### **3.10 PURIFICATION DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES KURLOFF**

Les cellules Kurloff spléniques provenant de cobayes traités aux œstrogènes ont été purifiées sur un premier gradient de Percoll 50 %. A partir de cette première purification, les cellules Kurloff ont été purifiées sur divers gradients de Percoll continus. Le tableau II résume le nombre et la pureté de cellules Kurloff obtenus pour chaque sous-population. La population de densité 1.076 g/ml représente la plus importante sous-population de cellules Kurloff avec  $50.8 \pm 1.9$  cellules Kurloff/rate ( $\times 10^6$ ). Ceci représente un écart d'environ  $40 \times 10^6$  cellules Kurloff avec la sous-populations de densité 1.087 g/ml qui est la plus faiblement représenté chez les cobayes œstrogénés. En général, toutes les sous-populations de cellules Kurloff sont purifiées avec un haut degré de pureté cellulaire (entre  $84.7 \pm 0.8$  et  $97.8 \pm 0.8$  %) tel qu'observé par la coloration Wright-Giemsa.

### **3.11 MORPHOLOGIE DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES KURLOFF**

Afin de visualiser les différences morphologiques des sous-populations de cellules Kurloff, celles-ci ont été traitées avec la coloration de Papanicolaou. La figure 10 illustre les deux extrêmes de la gamme de sous-populations de cellules Kurloff, soit celle de densité de 1.048 et de 1.100 g/ml. Cette coloration donne une couleur bleu foncé au noyau et bleu pâle au corps d'inclusion. La sous-population de densité (1.100 g/ml) semble très homogène en considération de la taille du corps d'inclusion (figure 10a), ce qui n'est pas le cas pour la sous-population de densité 1.048 g/ml

TABLEAU II

## Purification des sous-populations de cellules Kurloff

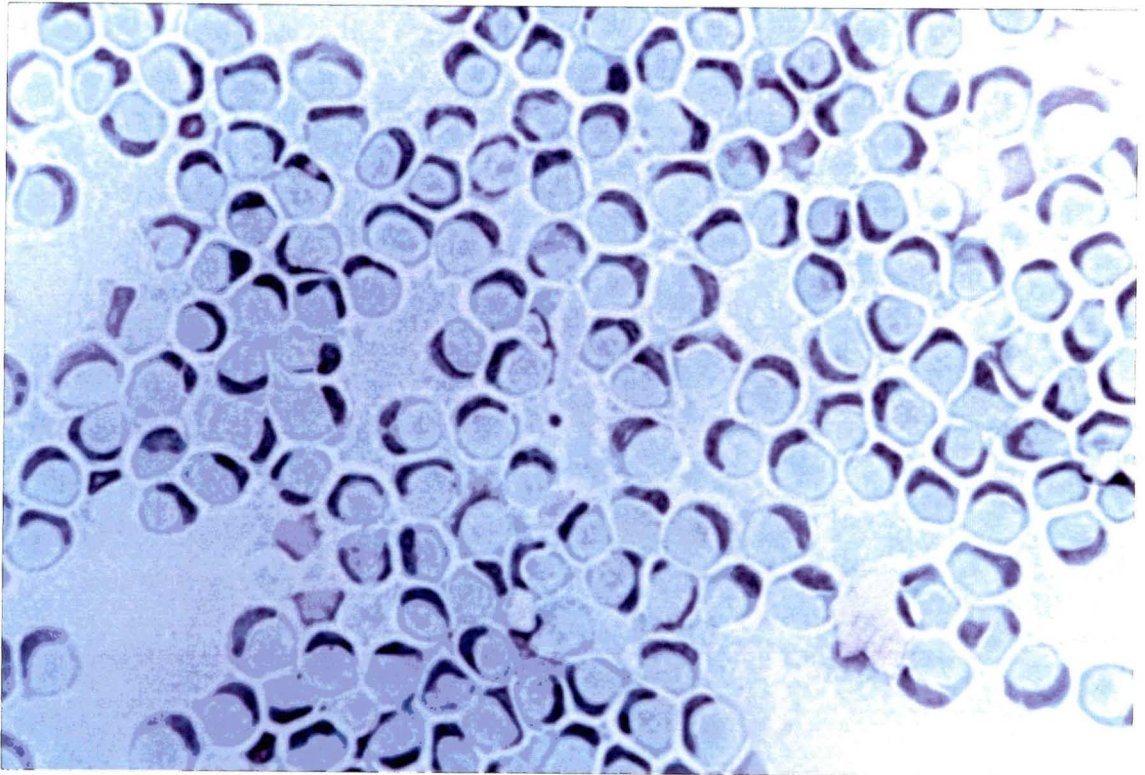
Densité cellulaire (g/ml)	1.048	1.062	1.076	1.087	1.100
Nombre de cellules (x 10 <sup>6</sup> )	23.1 ± 4.0	12.6 ± 2.3	50.8 ± 1.9	10.3 ± 1.9	16.2 ± 5.5
Pureté cellulaire (%)	93.9 ± 0.6	88.7 ± 1.6	94.7 ± 0.9	84.7 ± 0.8	97.8 ± 0.8
Rapport du nombre total (%)	20.6	10.6	45.6	8.3	15.0

Les valeurs sont les moyennes ± l'erreur type de 9 expériences.

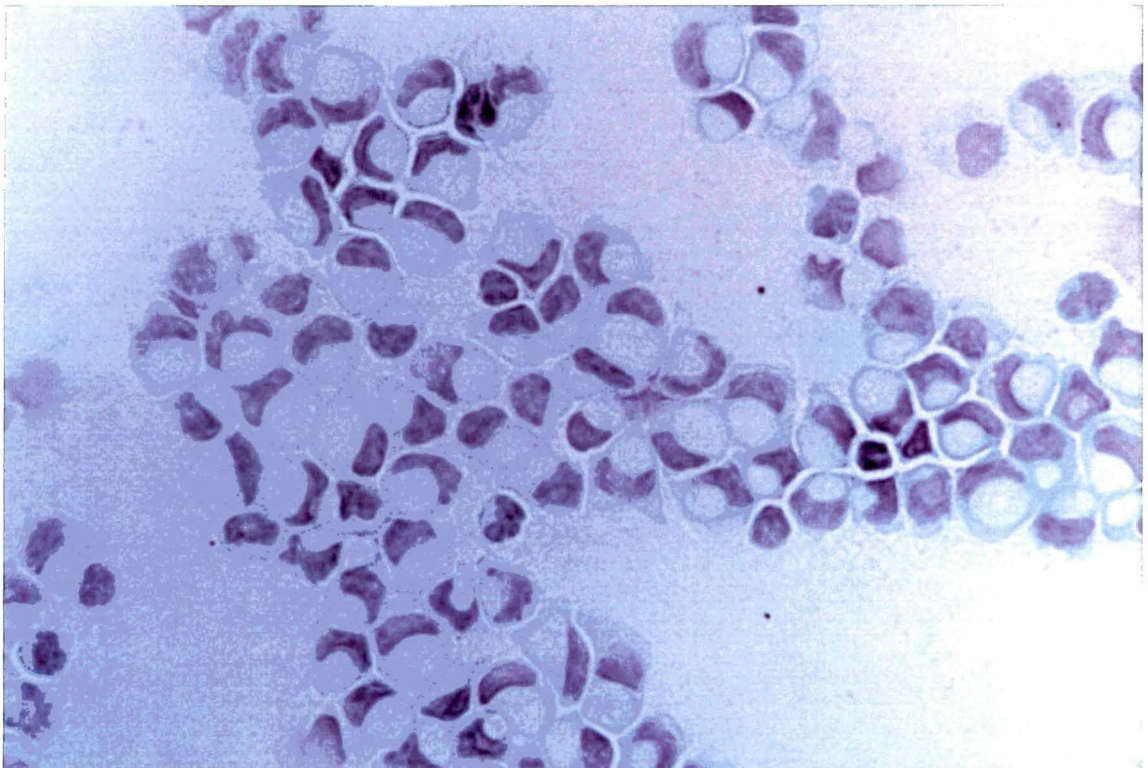
Figure 10: **Morphologie des sous-populations de cellules Kurloff.** Exemple représentatif d'une préparation cellulaire ( $0.1 \times 10^6$  cellules/cytospin) de cellules Kurloff de forte densité (1.100 g/ml) (a) et de faible densité (1.048 g/ml) (b). Ces préparations cellulaires ont été colorées selon la technique de Papanicolaou. En bleu foncé nous observons le noyau et en bleu pâle le corps d'inclusion des cellules Kurloff. (n = 9)



a)



b)



(figure 10b). La taille des inclusions cytoplasmiques des sous-populations de densités intermédiaires (1.062 à 1.087 g/ml) deviennent de plus en plus volumineuses et homogènes en parallèle avec la densité cellulaire (résultats non montrés).

### **3.12 MARQUAGE DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES KURLOFF PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX**

Au niveau des 5 sous-populations de cellules Kurloff purifiées, nous avons étudié la reconnaissance de ces diverses populations par les Acm produits. Pour ce faire, nous avons utilisé la dernière dilution donnant un marquage maximal (par cytométrie de flux) contre une population mixte de cellules Kurloff de haute densité. Il s'agit d'une dilution 1:2 pour les clones 14D1, 20F4 et 21G11 et d'une dilution 1:10 pour les clones 1A5, 6B9, 9F11, 16H6 et 21E12. Cette dilution a été utilisée afin d'éviter une sursaturation des épitopes à la surface des sous-populations de cellules Kurloff.

Tel que montré à la figure 11, les sous-populations de cellules Kurloff sont marquées par les 8 Acm préalablement sélectionnés. On remarque aussi un marquage moins important pour les sous-populations de plus faible densité, surtout la population de densité 1.048 g/ml. La différence de marquage ainsi obtenue est statistiquement significative.



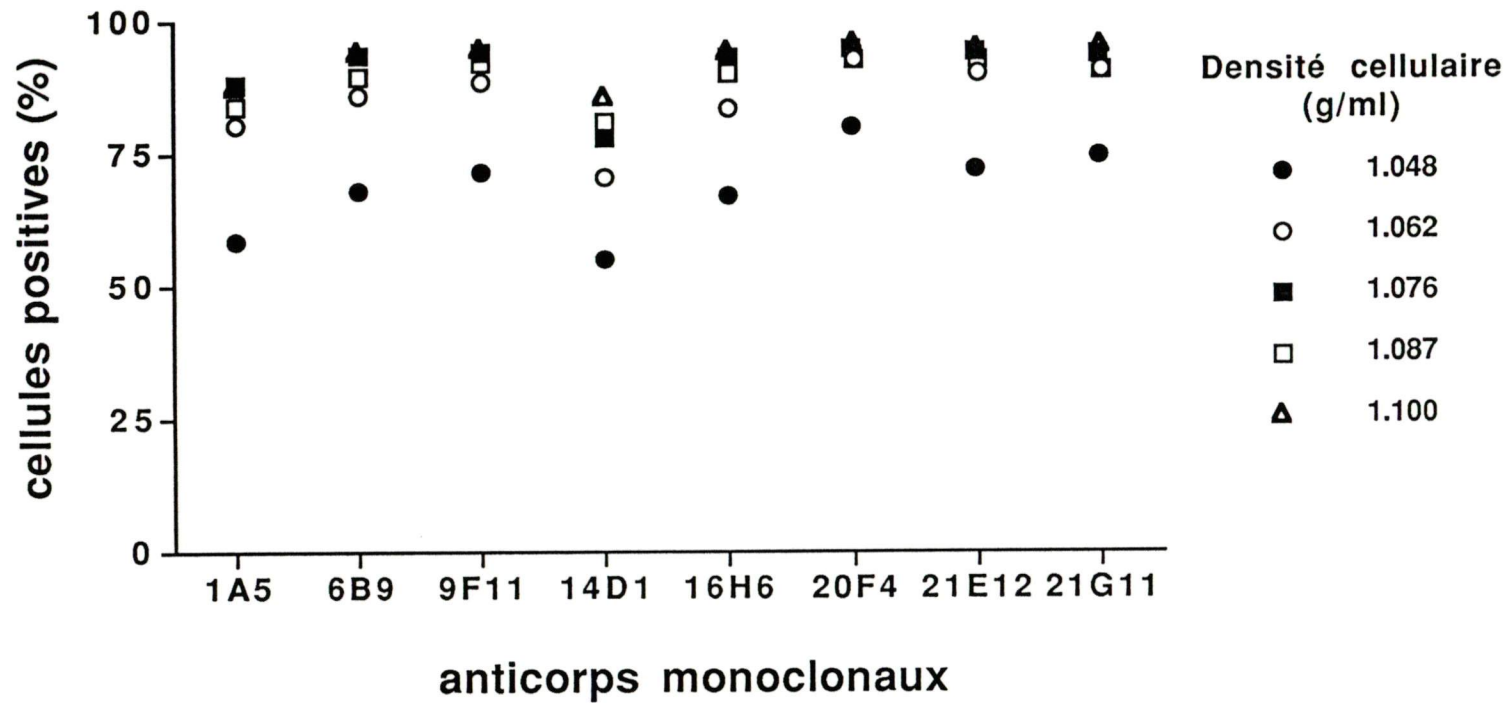


Figure 11: **Marquage des sous-populations de cellules Kurloff.** Les surnageants de milieux de culture (50  $\mu$ l/échantillon) ont été incubés pendant 45 min à 4 °C dans des tubes contenant les cellules Kurloff de diverses densités ( $5 \times 10^5$  cellules/échantillon). Les symboles représentent les densités cellulaires (g/ml) des différentes sous-populations de cellules Kurloff. La présence des Acm fixés aux cellules a été révélée par marquage indirect à l'aide d'un deuxième anticorps couplé à la fluorescéine. Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 3 expériences.



### 3.13 MARQUAGE DES CELLULES KURLOFF PAR IMMUNOFLUORESCENCE

Puisque nos Acn ont été produits par des plasmocytes de souris BALB/c sensibilisées avec des cellules Kurloff isolées de cobayes traités aux œstrogènes, nous avons voulu vérifier si ces Acn reconnaissent aussi les cellules Kurloff d'animaux non-traités. Pour ce faire, des cellules Kurloff ( $0.1 \times 10^6$  cellules/cytospine) isolées de cobayes non-traités (figure 12a) et de cobayes traités aux œstrogènes (figure 12b) ont été soumis à un test d'immunofluorescence.

La reconnaissance des cellules Kurloff par les Acn du clone 14D1 a été révélée par immunofluorescence à l'aide d'un deuxième anticorps anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine isothiocyanate. Les figures 12a et 12b représentent le marquage par l'Acn du clone 14D1 sur les cellules Kurloff (densités 1.076 à 1.100 g/ml) provenant d'animaux non-traités et traités aux œstrogènes, respectivement. Dans les deux cas, les cellules Kurloff sont effectivement fluorescentes. Ceci implique un marquage sélectif des cellules Kurloff par les Acn sécrétés par le clone 14D1 qui est indépendant du traitement aux œstrogènes.

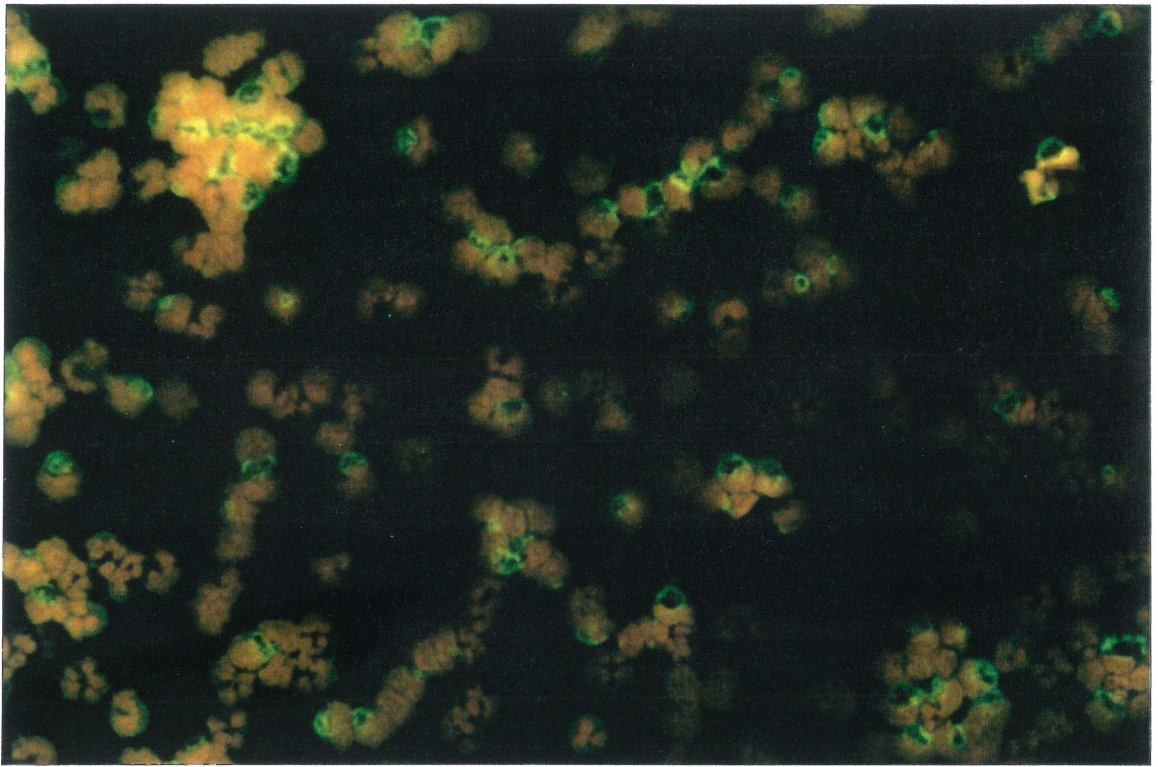
Les cellules Kurloff (densités 1.076 à 1.100 g/ml) provenant de la rate d'animaux témoins sont en nombre moins important (figure 12b). Cependant, ces cellules sont reconnues par les Acn du clone 14D1, tout comme les cellules Kurloff provenant d'animaux traités aux œstrogènes. Un résultat semblable a été obtenu avec les Acn 9F11, 16H6 et 20F4. Aucune immunofluorescence n'a été observée avec un anticorps témoin de

**Figure 12: Marquage des cellules Kurloff par immunofluorescence.**

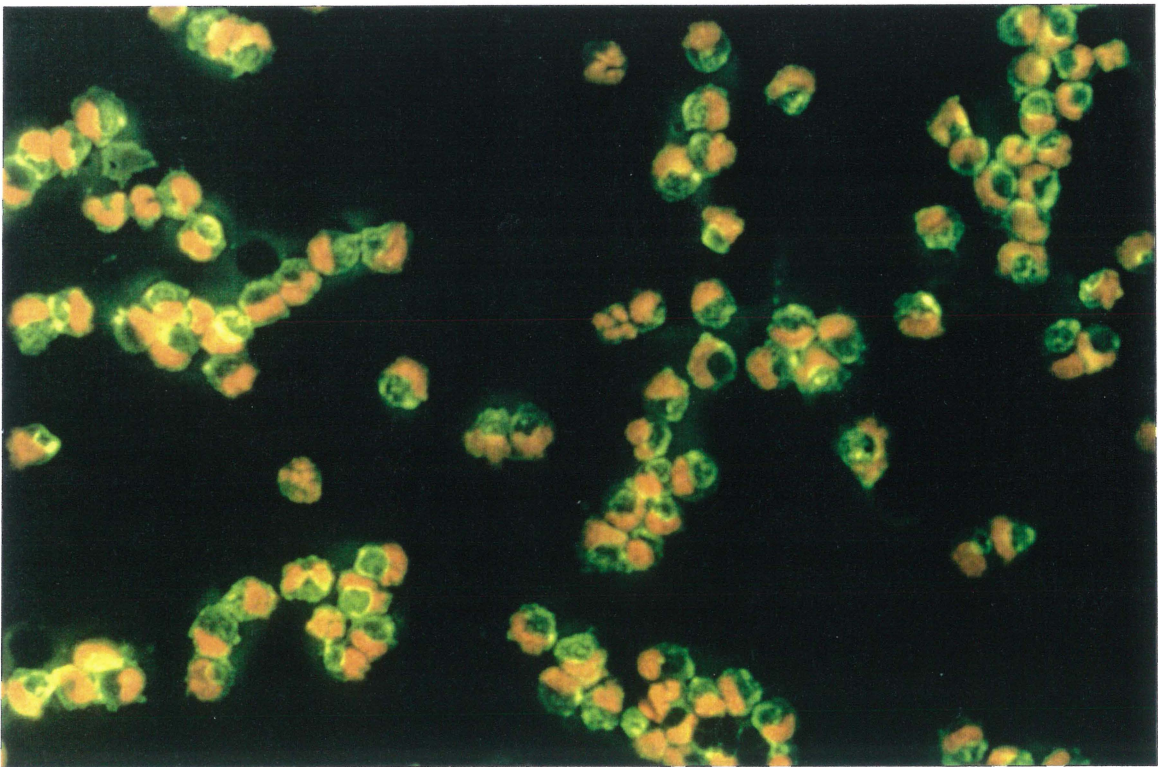
Exemple représentatif d'une préparation cellulaire ( $0.1 \times 10^6$  cellules/cytospin) de cellules Kurloff d'un cobaye non-traité (a) et d'un cobaye traité aux œstrogènes (b). Les préparations cellulaires ont été incubées en présence de l'Acm 14D1 (dilution 1:10) pendant 1 heure à 20 °C. (n = 4)



a)



b)





même isotype que les Acm anti-cellules Kurloff (résultat non montré).

### **3.14 MARQUAGE DES CELLULES KURLOFF PAR LA TECHNIQUE D'IMMUNOGOLD**

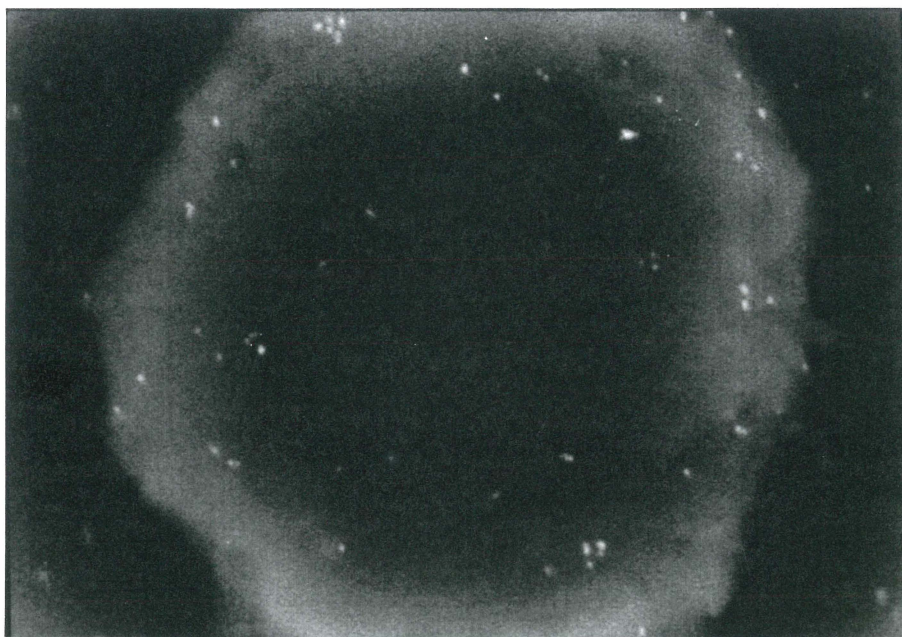
Cette technique appliquée à la microscopie à balayage en mode électron rétrodiffusé nous permet de voir plus spécifiquement la distribution des entités cellulaires reconnues par les Acm.

La figure 13a illustre la reconnaissance de la liaison de l'Acm du clone 14D1 sur les cellules Kurloff (densité 1.076 à 1.100 g/ml) provenant d'animaux non-traités aux œstrogènes. La liaison de l'Acm est mise en évidence par la présence de taches blanches correspondant aux billes d'or fixées au deuxième Ac anti-IgG de souris. Le marquage par immunoGold nous a révélé la distribution homogène des épitopes reconnus par l'Acm produit par le clone 14D1.

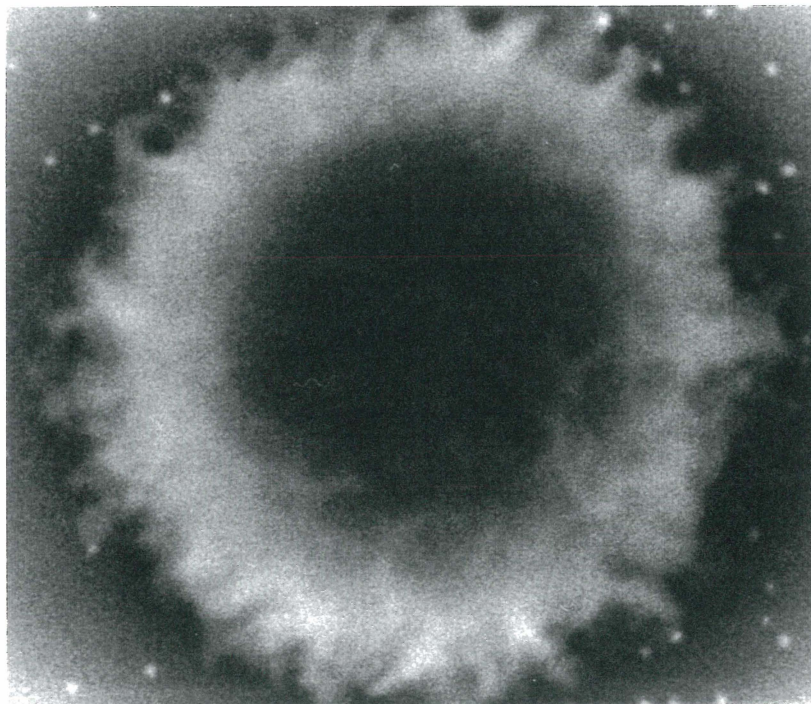
Les cellules contaminantes (non cellules Kurloff) provenant aussi d'animaux témoins ne sont pas marquées par l'Acm du clone 14D1 (figure 13b). Cependant, la présence de 2 ou 3 taches blanches (billes d'or) à la surface de cette cellule contaminante ne représente qu'un bruit de fond semblable à celui observé dans les figures 8 et 9. Aucun marquage n'a été observé avec un anticorps non-spécifique de même isotype que l'Acm 14D1 (résultat non montré).

**Figure 13: Marquage des cellules Kurloff par la technique d'ImmunoGold.** Exemple représentatif d'une cellule Kurloff (x 450) (a) et d'une cellule contaminante (x 650) (b) provenant d'un cobaye non-traité aux œstrogènes. Cinquante ml d'échantillon cellulaire a été déposé sur une lamelle (d = 12 mm) préalablement traitée à la poly-L-lysine. Ces lames sont incubés en présence de 100 ml de surnageant de milieu de culture d'Acm 14D1 pendant 1 heure à 37 °C (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>). La présence des Acm sur les cellules Kurloff a été révélé par un deuxième Ac lié a des billes d'or de 30 nm. (n = 2)

a)



b)





### **3.15 MARQUAGE DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES KURLOFF PAR L'ANTI-CD16h ET L'ANTI-CD56h**

Nous avons à notre disposition des anticorps monoclonaux commerciaux (Becton Dickinson, CA) dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules NK humaines. Le marquage de ces Acm murins anti-CD16h et anti-CD56h a été étudié de la même façon sur toutes les sous-populations de cellules Kurloff.

Tel qu'indiqué à la figure 14, l'anti-CD56h se fixe de manière spécifique aux sous-populations de cellules Kurloff avec un marquage approchant 70 % de liaison pour la sous-population de 1.100g/ml. Cependant, moins de 10 % des diverses sous-population de cellules Kurloff ont été marquées par l'anti-CD16h.

### **3.16 ACTIVITÉ CYTOTOXIQUE DES SOUS-POPULATIONS DE CELLULES KURLOFF**

Nous avons déterminé au niveau des 5 sous-populations de cellules Kurloff purifiées, l'activité NK mesuré par le relâchement spécifique de  $^{51}\text{Cr}$  par des cellules cibles murines NK-sensibles (YAC-1). Les résultats présentés à la figure 15 indiquent que les sous-populations de plus faible densité (1.048, 1.062 et 1.076 g/ml) possèdent une activité NK plus importante que les cellules Kurloff de plus forte densité (1.087 et 1.100 g/ml). Ces premiers possédaient une activité cytotoxique de  $15.8 \pm 1.7$ ,  $10.1 \pm 1.9$  et  $10.0 \pm 3.2$  unités lytiques contre la cellule cible YAC-1 alors que les cellules Kurloff de plus forte densité ont présenté une activité cytotoxique

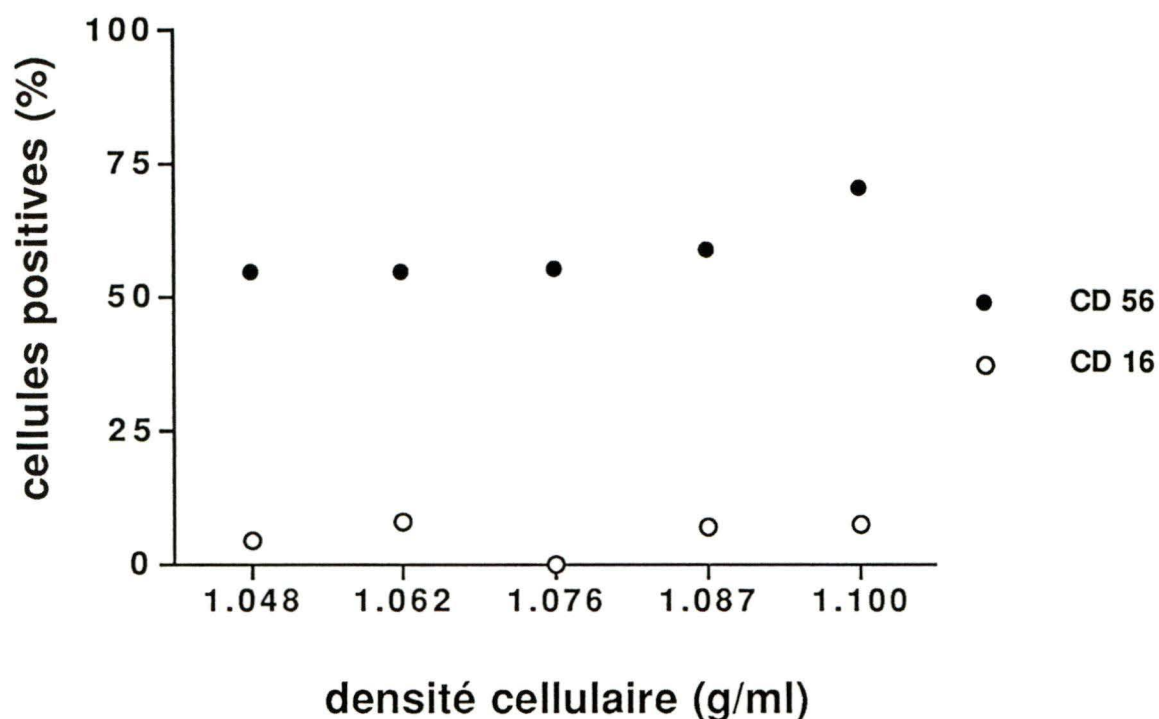


Figure 14: **Marquage des sous-populations de cellules Kurloff par les anticorps anti-CD56h et anti-CD16h.** Les Acm anti-CD16h et anti-CD56h (50 ml/échantillon) ont été incubés pendant 45 min à 4 °C dans des tubes contenant des cellules Kurloff de différentes densités (1.048 à 1.100 g/ml) ( $5 \times 10^5$  cellules/échantillon). La présence des Acm fixés aux cellules a été révélée par marquage indirect à l'aide d'un deuxième anticorps couplé à la fluorescéine. (expérience représentative)

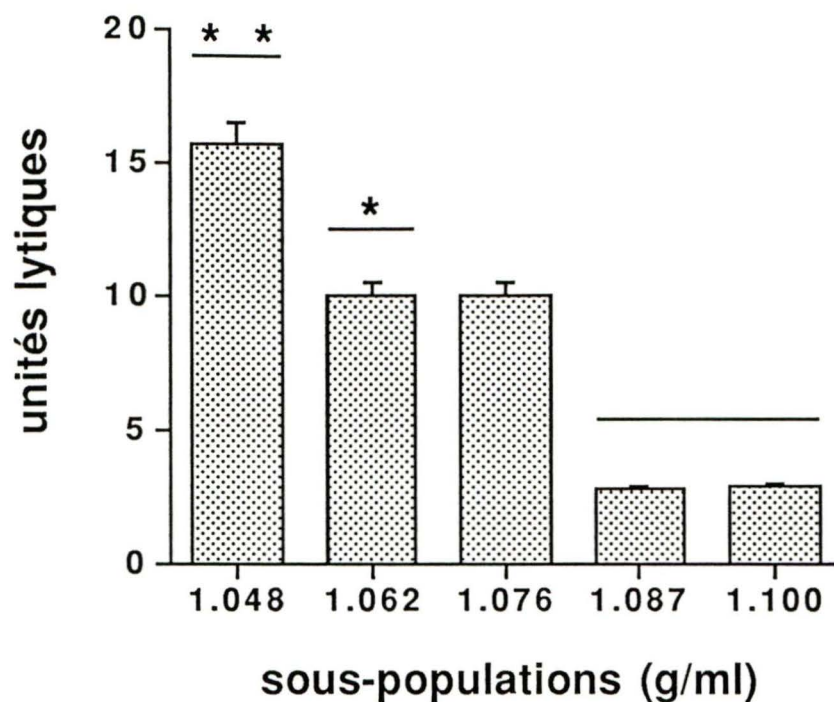


Figure 15: **Activité cytotoxique des sous-populations de cellules Kurloff.**

Des cellules cibles murines YAC-1 sensibles aux NK ( $5 \times 10^4$  cellules/puits) ont été incubées pendant 4 heures à 37 °C dans une atmosphère humidifiée (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) en présence des diverses sous-populations de cellules Kurloff. Les ratio cellules effectrices: cellules cibles étaient; 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 et 6.25:1. Le pourcentage de cytotoxicité obtenu est exprimé en unité lytique (PROSS et coll., 1981) Les valeurs sont la moyenne  $\pm$  l'écart-type de 5 à 9 expériences.



de  $2.8 \pm 0.7$  et  $2.9 \pm 0.8$  unités lytiques respectivement dans les mêmes conditions expérimentales.

### **3.17 MODULATION DE L'ACTIVITÉ NK CYTOTOXIQUE DES CELLULES KURLOFF PAR LE 14D1**

Nous avons voulu vérifier si l'Acm sécrété par le clone 14D1 pouvait moduler l'activité NK des cellules Kurloff. L'effet de l'Acm 14D1 sur l'activité NK des cellules Kurloff a été testé avec une population mixte de cellules Kurloff de densité 1.076 à 1.100 g/ml contre la lignée cellulaire murine YAC-1 NK-sensible. La population mixte de cellules Kurloff provenant de la bande inférieure du gradient de Percoll de 50 % a été utilisée pour réaliser cette expérience. L'effet des Acm du clone 14D1 a été comparé avec celui obtenu avec le myélome NSO et le surnageant d'un anticorps monoclonal murin de même isotype.

Bien que l'Acm 14D1 semble augmenter l'activité NK des cellules Kurloff ( $10.7 \pm 2.3$  unités lytiques) en comparaison avec l'effet de l'Acm de même isotype ( $6.8 \pm 2.0$  unités lytiques) et le surnageant du myélome NSO ( $6.4 \pm 1.4$  unités lytiques), cette augmentation de l'activité cytotoxique n'est pas statistiquement significative (figure 16).

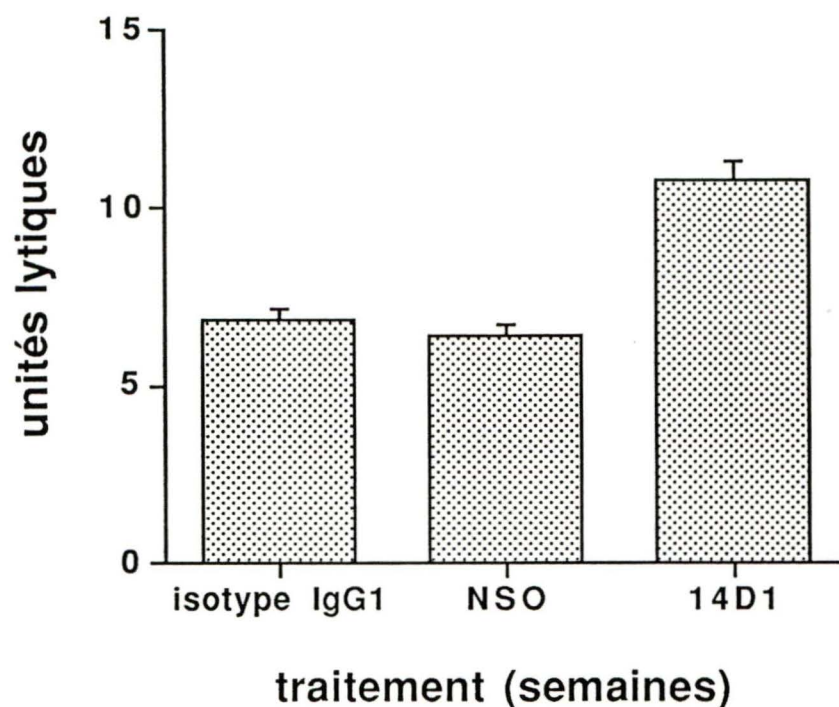


Figure 16: **Modulation de l'activité cytotoxique des cellules Kurloff par l'anticorps monoclonal 14D1.** Des cellules cibles murines YAC-1 sensibles aux NK ( $5 \times 10^4$  cellules /puits) ont été incubées pendant 4 heures à 37 °C dans une atmosphère humidifiée (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) en présence d'une population mixte de cellules Kurloff (1.076 à 1.100 g/ml). Les ratios cellules effectrices:cellules cibles étaient; 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1 et 6.25:1. L'effet du surnageant de l'Acm 14D1 a été comparé à l'effet du surnageant du myélome NSO et le surnageant d'un Acm non-spécifique de même isotype que l'Acm 14D1. Le pourcentage de cytotoxicité obtenu est transformé en unité lytique (PROSS et coll., 1981) Les valeurs sont la moyenne ± l'écart-type de 8 expériences.

## **DISCUSSION**



Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué chez le cobaye l'effet du traitement à l'œstradiol sur l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans le sang, la moëlle osseuse et la rate. LEDINGHAM (1940) a remarqué un changement cyclique du nombre de cellules Kurloff sanguines chez des cobayes femelles normales qui correspondait à leur cycle œstrogénique de 16 jours. Depuis, DEBOUT et coll. (1983) ont montré que le nombre de cellules Kurloff dans le sang était proportionnel à la concentration d'œstrogènes. Nous avons effectivement observé une augmentation du nombre de cellules Kurloff dans le sang au cours du traitement aux œstrogènes. Cependant, malgré un traitement hormonal prolongé, le nombre de cellules Kurloff dans le sang a diminué. Dans notre étude, le nombre de cellules Kurloff déterminé dans le sang était plus faible que celui observé dans d'autres études (DEBOUT et coll., 1983; REVELL, 1974; LEDINGHAM, 1940). ROOFE et coll. (1950), cité par QUILLEC et coll. (1977) ont montré que le site de prélèvement sanguin (cardiaque ou périphérique) peut influencer les résultats des comptes cellulaires. Cependant, la plupart des études sur le nombre de cellules Kurloff dans le sang proviennent de ponctions cardiaques.

Diverses études de splénectomies (HEINLE et HEYDINGER, 1944) et de thymectomies (RANLOV et coll., 1970) ont montré que les cellules Kurloff ne trouvaient pas d'origine dans ces deux organes. Sachant que les cellules Kurloff sanguines augmentent en nombre suivant un traitement aux œstrogènes, nous avons voulu voir si le nombre de cellules à inclusions cytoplasmiques de la moëlle osseuse augmentait dans les mêmes conditions. Le nombre des cellules Kurloff dans la moëlle osseuse de cobaye augmente de façon importante une semaine après la deuxième

administration d'œstradiol. De plus, ce nombre continue à augmenter au cours du traitement hormonal.

La présence des cellules Kurloff au niveau de la moëlle osseuse a été décrite par plusieurs auteurs (ERNSTRÖM et SANDBERG, 1971; KORTELAINE et KORHONEN, 1976 b; KITTAS et coll., 1979). SANDBERG et HAGELIN (1986) ont tenté, sans succès, d'induire *in vitro* la formation de cellules Kurloff à partir de cellules provenant de la moëlle osseuse, de la rate et du thymus en les stimulants avec de l'œstradiol ou du sérum de cobayes traités aux œstrogènes. L'œstradiol semble agir indirectement pour stimuler la formation de cellules Kurloff car ces cellules augmentent seulement après une période de 5 jours suivant le traitement à l'œstradiol. Depuis, LANDEMORE et coll. (1988) ont décrit la présence d'un site de liaison de faible affinité ( $K_d \sim 11$  nM) pour l'œstradiol sur les cellules Kurloff. Cependant, la signification biologique de ce site n'a pas encore été déterminée.

La plupart des études sur les cellules Kurloff utilisent des cellules provenant de la rate. Après un traitement aux œstrogènes, la rate est l'organe qui permet d'isoler un grand nombre de cellules avec un bon niveau de pureté (LANDEMORE et coll., 1984; MAGHNI et coll., 1991). Nous avons montré que le nombre de cellules Kurloff spléniques est à son maximum après 3 semaines de traitement hormonal. SANDBERG et HAGELIN (1986) ont décrit trois catégories de cellules Kurloff en se basant sur la taille et le nombre d'inclusions cytoplasmiques. En résumé, la catégorie I englobait les petites cellules Kurloff avec un corps d'inclusion qui semblait être fractionné en morceaux. Les cellules Kurloff avec des



petites ou des grosses inclusions cytoplasmiques entières représentaient les catégories II et III respectivement. Selon une analyse de distribution cellulaire en microscopie électronique, ces auteurs ont décrit que le traitement à l'œstradiol serait associé à un changement des cellules Kurloff de la catégorie I aux catégories II et III. Ceci indiquerait que les différentes catégories représentent des étapes de maturation des cellules Kurloff. Malgré le fait que nous n'ayons pas observé des cellules Kurloff avec une inclusion cytoplasmique fractionnée en morceaux, nous avons par contre observé une maturation des cellules Kurloff spléniques au cours du traitement à l'œstradiol. On a remarqué que le passage de cellules Kurloff de plus faible densité (plus petite inclusion; 1.048 à 1.062 g/ml) à des cellules de plus forte densité (plus grosse inclusion; 1.076 à 1.100 g/ml) se produit après la troisième injection d'œstradiol.

Nous avons voulu savoir s'il existait une relation entre l'augmentation des cellules Kurloff dans le sang, la moëlle osseuse et la rate. Nous avons ainsi observé que l'augmentation de cellules Kurloff au cours du temps dans la rate est proportionnelle à l'augmentation observée dans la moëlle osseuse ( $r = 0.824$ ) tandis que l'augmentation de cellules Kurloff dans le sang ne semble pas reliée à l'augmentation de ces cellules dans la moëlle osseuse.

Il semble établi que la moëlle osseuse soit la source première de production de cellules Kurloff (KITTAAS et coll., 1979; ADAMS, 1977). Des études sur la distribution tissulaire des cellules Kurloff (IZARD et coll., 1976) ont montré que le nombre de cellules Kurloff augmente dans les tissus richement vascularisés, suite à un traitement hormonal.



Cependant, des études récentes ont montré la présence des cellules Kurloff au niveau des canaux lymphatiques (REVELL et coll., 1971; ERNSTROM et SANDBERG, 1971) et ont montré leur migration dans le tissu lymphatique du thymus des cobayes (SANDBERG et HAGELIN, 1990).

La corrélation positive obtenue pour l'augmentation du nombre de cellules Kurloff entre la moëlle osseuse et la rate (figure 6 a) et l'absence de corrélation entre le sang et la rate (figure 6 b) pourrait signifier que les cellules Kurloff produites au niveau de la moëlle osseuse infiltrent les divers organes et tissus en empruntant la circulation lymphatique préférentiellement à la circulation sanguine. Cette hypothèse est supportée par le fait que le nombre de cellules Kurloff retrouvées dans le sang est très faible en comparaison du nombre de ces cellules observée dans la moëlle osseuse après le traitement aux œstrogènes.

La rate de cobayes traités aux œstrogènes est l'organe de choix pour l'obtention d'un grand nombre de cellules Kurloff avec une viabilité et une pureté cellulaire supérieure à 95 % (LANDEMORE et coll., 1984; MAGHNI et coll., 1991) C'est à partir d'une préparation de cellules Kurloff spléniques purifiées que nous avons sensibilisé des souris BALB/c afin de produire des anticorps monoclonaux (Acm) anti-cellules Kurloff.

Sur les 1984 clones obtenus après fusion membranaire et culture cellulaire dans des milieux sélectifs, nous avons sélectionné, dans un premier temps par essai ELISA, 26 clones qui produisaient des Acm plus spécifiques pour les cellules Kurloff en comparaison des macrophages alvéolaires et des lymphocytes spléniques de cobaye.

Notre deuxième critère de sélection a été la production d'Acm par les 26 clones sélectionnés. Sur la base du titre en Acm produits par chacun des 26 clones, 14 clones ont été retenus.

Finalement, notre dernier critère de sélection a été une caractérisation des Acm par cytométrie de flux, sur une gamme plus extensive de cellules immunocompétentes de cobaye. Cette dernière étape nous a permis de sélectionner les 8 Acm les plus spécifiques pour la reconnaissance des cellules Kurloff. Un de ces huit Acm, le 14D1, a fait l'objet d'études plus extensives au cours de ce travail.

La détermination de l'isotype des 8 Acm préalablement sélectionnés a permis de montrer qu'ils possédaient tous l'isotype IgG1, suggérant un changement de classe d'immunoglobulin après sensibilisation prolongé des souris BALB/c aux cellules Kurloff. La sensibilisation d'un animal de façon répétée à un antigène donne lieu tout d'abord à la formation d'anticorps polyvalents et moins spécifiques de type IgM qui seront progressivement remplacés par des anticorps de plus grande affinité de type IgG.

Jusqu'à présent, les études *in vitro* sur les cellules Kurloff ont été réalisées sur des populations cellulaires de densité 1.087 à 1.100 g/ml (LANDEMORE et coll., 1984; MAGHNI et coll., 1991). Nous avons donc décidé de purifier diverses sous-populations de cellules Kurloff sur la base de leur densité. Nous avons ainsi obtenu 5 sous-populations de cellules de densité 1.048 à 1.100 g/ml. La sous-population de densité 1.100 g/ml était

constituée de cellules Kurloff avec une inclusion cytoplasmique de taille importante et uniforme en comparaison de la sous-population de densité 1.048 g/ml dans laquelle les inclusions étaient de taille plus diverses. Les autres sous-populations de cellules Kurloff de densité intermédiaire présentent une certaine hétérogénéité quant à la taille de la cellule et de l'inclusion cytoplasmique.

Nos résultats montrent aussi que la sous-population de densité 1.076 g/ml est la population majoritaire de cellules Kurloff retrouvée au niveau de rate de cobayes traités aux œstrogènes. Nous avons ainsi purifié 5 sous-populations de cellules Kurloff sur la base de leur densité cellulaire. Cette classification des cellules Kurloff selon leur densité ne tient pas compte de certains critères biochimiques et immunologiques. Une classification des cellules Kurloff basée sur certaines activités cellulaires (activités enzymatiques, activité NK...) et/ou sur la présence de certains marqueurs immunologiques serait aussi utile. A ce titre, nous avons déterminé s'il était possible de distinguer ces 5 sous-populations sur la reconnaissance de ces cellules par les Acm produits par les 8 clones préalablement sélectionnés. A l'aide de la technique de cytométrie de flux, nous avons observé que les cinq sous-populations ont été reconnues par les Acm. Cependant, il est intéressant de noter que la sous-population de cellules Kurloff de densité 1.048 g/ml a été plus faiblement marquée par les 8 Acm. Ces résultats suggèrent que les divers épitopes reconnus par les Acm sont exprimés de la même façon au niveau des sous-populations de cellules Kurloff, à l'exception des cellules de densité 1.048 g/ml. Ce marquage plus faible de cette sous-population de cellules Kurloff peut provenir d'une expression moins importante des épitopes reconnus par les Acm.



SCHUURS et VERHEUL (1990) ont montré que les hormones sexuelles pouvaient moduler certaines réponses immunologiques tels que l'immunité humorale et à médiation cellulaire, l'allergie, l'autoimmunité ainsi que l'activité NK. DEBOUT et coll. (1991) proposèrent qu'un mécanisme responsable de ces modulations était une modification de l'expression des produits du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC). Ils ont montré ainsi que l'œstradiol diminuait l'expression des antigènes du MHC des classes I et II sur les cellules mononucléaires incluant les cellules Kurloff. Cependant, le même traitement hormonal n'influence pas l'expression du MHC chez les cellules polymorphonucléaires qui ne sont pas impliquées dans la réponse immune. Sur la base de ces données, nous avons voulu vérifier si le traitement aux œstrogènes pouvait modifier l'expression des épitopes reconnus par les AcM. Nous avons réalisé cette étude en utilisant les AcM du clone 14D1 dirigés contre les cellules Kurloff spléniques de cobaye témoins et sur celles traités aux œstrogènes. Une étude par immunofluorescence a permis de montrer que les AcM 14D1 ne liaient que les cellules Kurloff (présence de fluorescence) et que les entités reconnues par ces AcM étaient aussi présentes au niveau des cellules Kurloff spléniques de cobayes témoins. Ce résultat suggère que le traitement aux œstrogènes n'a pas modifié la reconnaissance par l'AcM 14D1.

Dans le but de vérifier la distribution cellulaire des entités reconnus par les AcM, nous avons effectués la même étude à l'aide de la technique d'immunoGold. Cette méthode d'immunodétection beaucoup plus sensible et précise nous a révélée la distribution homogène des

épitopes reconnus par l'Acm 14D1. De plus, l'immunoGold a confirmé les résultats obtenus par immunofluorescence. Les cellules Kurloff provenant de cobayes traités aux œstrogènes ont été marquées de la même façon (résultat non montré) que les cellules Kurloff provenant de cobayes témoins. Ces résultats suggèrent que le traitement hormonal ne modifie pas l'expression de l'épitope reconnu par l'Acm 14D1. De plus, les cellules contaminantes (non cellules Kurloff) n'ont pas été marquées par l'Acm 14D1 (figure 13b). La présence de quelques billes d'or (taches blanches) à la surface de cette cellule contaminante représente un bruit de fond de l'Acm 14D1 tel qu'observé aux figures 8 et 9.

L'activité cytotoxique de type NK a déjà été observée chez le cobaye. Cette activité est attribuée en grande partie aux cellules Kurloff. DEBOUT et coll. (1984), EREMIN et coll. (1980 a,b) et ALTMAN et RAPP (1978) ont même observé que l'activité cytotoxique de divers tissus est proportionnelle au nombre de cellules Kurloff présentes dans ces tissus. DEBOUT et coll. (1993) et POULIOT (1991) ont caractérisé davantage les mécanismes des activités cytotoxiques des cellules Kurloff. Cependant, l'appartenance des cellules Kurloff à la famille des cellules NK n'est pas encore démontrée.

Les cellules Kurloff possédant une activité NK, il devenait intéressant de déterminer si les marqueurs spécifiques des cellules NK humaines ou de rat se trouvaient présents sur ces cellules. Les cellules NK humaines sont principalement caractérisées par l'absence des molécules CD3/TCR et par l'expression des antigènes de surface CD16 et CD56 (MORETTA et coll., 1989). L'antigène CD16 est une protéine de 50 à 70 KDa associée à un récepteur pour les fragments Fc



d'immunoglobulines gamma (PERUSSIA et coll., 1983 a,b; RUMPOLD et coll., 1982). Le CD16 (Fc $\gamma$ RIII) médie la liaison de complexes immuns et l'activité cellulaire cytotoxique dépendante des anticorps (ADCC; Antibody-Dependant Cellular Cytotoxicity) (PERUSSIA et coll., 1984; KIPPS et coll., 1985). L'antigène CD56 (NKH1 ou Leu 19) est une glycoprotéine de 200 KDa dont les fonctions sont inconnues (GARCIA-SUAREZ et coll., 1993; HERCEND et coll., 1985). Contrairement au CD16, le CD56 n'est pas exprimé par les neutrophiles (HERCEND et coll., 1985). Le CD56 apparaît plutôt à la surface des cellules NK activées (GARCIA-SUAREZ, 1993).

Nous avons à notre disposition des Acm commerciaux dirigés spécifiquement contre les marqueurs CD16 et CD56 chez les cellules NK humaines. Nous avons testé si ces Acm murins anti-CD16h et anti-CD56h étaient capables de marquer les sous-populations de cellules Kurloff. Nous avons observé que les sous-populations de cellules Kurloff étaient marquées entre 55 et 70 % par l'anti-CD56h. Ce premier résultat indique que les cellules Kurloff semblent exprimer un épitope semblable à celui reconnu par l'anti-CD56. Cependant, selon la sous-population étudiée, environ 30 à 45 % des cellules Kurloff ne sont pas marquées par l'anti-CD56. Ce résultat indique que chacune des sous-populations de cellules Kurloff purifiées contient au moins une sous-population de cellules ne possédant pas le marqueur reconnu par les Acm anti-CD56. Ces résultats suggèrent que la classification des cellules Kurloff selon leur densité n'est pas un paramètre suffisant pour caractériser les sous-populations de cellules Kurloff et que des marqueurs immunologiques sont nécessaires pour compléter la classification des sous-populations. Une hétérogénéité dans l'expression de marqueurs présents au niveau des cellules NK



humaines a été aussi montrée (LANIER et coll., 1986; RITZ et coll., 1988; ROBERTSON et coll.; 1990).

Le marquage des cellules Kurloff par les Acm anti-CD56 renforce l'hypothèse de l'appartenance des cellules Kurloff à une population de cellules NK. Cependant, le fait qu'un très faible marquage ait été observé avec l'Acm anti-CD16h n'exclut pas le fait que les cellules Kurloff n'expriment pas le CD16 (Fc $\gamma$ RIII). EREMIN et coll., (1980 a) ont montré que les cellules Kurloff possédaient une activité ADCC suggérant la présence du récepteur CD16 sur ces cellules.

DEBOUT et coll. (1991) ont caractérisé certains antigènes de surface des cellules Kurloff. Ils ont ainsi exclu la possibilité d'une association entre les cellules Kurloff et la lignée monocyte/macrophage (MR-I<sup>-</sup>), la lignée de lymphocytes B (CT10<sup>-</sup>, IgM<sup>-</sup>) et la lignée lymphocyte T cytotoxique suppresseur (CT6<sup>-</sup>). L'immunophénotype des cellules Kurloff correspond à celui d'un thymocyte mature (pan T, CT7<sup>+</sup>, 8BE6<sup>-</sup>). Ces auteurs ont conclu que la cellule Kurloff se classe parmi les cellules NK effectrices exprimant des marqueurs des lymphocytes T. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse de la maturation des cellules Kurloff au niveau du thymus suggéré par SANDBERG et HAGELIN (1986). Il serait intéressant de vérifier l'expression de ces antigènes de surface sur les 5 sous-populations de cellules Kurloff que nous avons identifiées.

Nous avons vérifié l'activité cytotoxique de chacune des sous-populations de cellules Kurloff contre la cellule cible murine NK-sensible YAC-1. Les sous-populations de plus faible densité ont présenté l'activité

cytotoxique la plus importante. Ce résultat est intéressant car il indique que l'activité NK dépendrait des cellules Kurloff ayant une propriété physique particulière, ce qui permettrait peut-être une classification des sous-populations de cellules Kurloff suivant leur activité NK vis-à-vis une cellule tumorale donnée.

Nous aurions pu nous attendre à ce que les cellules de plus forte densité, possédant une plus grande inclusion cytoplasmique, présentent une activité NK plus marquée que les cellules Kurloff de densité cellulaire inférieure. Le traitement aux œstrogènes n'augmente cependant pas les activités phosphatase acide, triméthaphosphatase (TIFFON et coll., 1986; LANDEMORE et coll., 1987) et arylsulphatase (BUAT et coll., 1988) présentes au niveau de l'inclusion cytoplasmique. Ces activités sont potentiellement responsables de la lyse des cellules cibles tumorales (MacDERMOTT et coll., 1985; PARMLEY et coll., 1985). Ces résultats suggèrent que l'activité NK des cellules Kurloff est indépendante de la taille de l'inclusion cytoplasmique.

Certains Acm dirigés spécifiquement contre des antigènes présents sur les cellules NK peuvent moduler l'activité cytotoxique de ces cellules. MORETTA et coll. (1993) ont montré que des Acm anti-CD2 et anti CD-16 augmentent le pouvoir lytique de toutes lignées cellulaires effectrices exprimant ces antigènes de surface. A l'inverse, LOUGHRAN et coll. (1993) ont rapporté que des Acm anti-CD18 diminuent le pouvoir lytique des cellules NK chez le chien. D'autres auteurs (HOSKIN et RODER, 1992) ont produit un nouvel Acm qui reconnaît une structure membranaire impliquée dans la reconnaissance des cellules cibles et par ce fait, inhibe

l'activité cytotoxique des cellules NK murines. Sur la base de ces observations, nous avons vérifié l'effet des Acm produits par le clone 14D1 sur l'activité NK d'une population mixte de cellules Kurloff (1.076 à 1.100 g/ml). Nos résultats montrent que le 14D1 semble moduler positivement l'activité NK des cellules Kurloff. Cependant, cette augmentation de l'activité NK induite par les Acm du clone 14D1 n'est pas significative. De plus, les Acm du clone 14D1 n'ont pas augmenté significativement l'activité NC des cellules Kurloff (résultats non montrés).



## **CONCLUSIONS**

Dans la présente étude, nous avons établi que l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans la rate au cours d'un traitement à l'œstradiol est en corrélation ( $r = 0.824$ ) à l'augmentation du nombre de cellules Kurloff dans la moëlle osseuse. Cette même augmentation au niveau de la rate ne semble pas être proportionnelle ( $r = 0.053$ ) avec l'augmentation de cellules Kurloff observé au niveau du sang.

Nous avons identifié et purifié 5 sous-populations de cellules Kurloff sur la base de leur densité cellulaire (1.048, 1.062, 1.076, 1.087 et 1.100 g/ml). La sous-population de plus forte densité est très homogène en considération de la taille de son corps d'inclusion, ce qui n'est pas le cas pour les sous-populations de plus faible densité. Nos études ont aussi montré que la population de densité 1.076 g/ml représente la sous-population de cellules Kurloff la plus importante en nombre.

Nous avons aussi produit et caractérisé 8 Acm (isotype: IgG1) dirigés spécifiquement contre les cellules Kurloff de cobaye. Toutes les sous-populations de cellules Kurloff ont été marquées par ces Acm avec un plus faible marquage pour la population cellulaire de 1.048 g/ml. Les études d'immunofluorescence ont montré que l'Acm 14D1 reconnaît les cellules Kurloff provenant de cobayes témoins et les cellules Kurloff provenant de cobayes traités aux œstrogènes. Cette observation a été confirmée par microscopie électronique à l'aide de la technique d'ImmunoGold.

Une proportion importante des cellules Kurloff (entre 55 et 70 %) ont été marquées par un Acm commercial (anti-CD56h) dirigé spécifiquement

contre le marqueur le plus spécifique des cellules NK humaines. Ce marquage suggère l'existence d'un marqueur semblable au CD56 sur les cellules Kurloff rapprochant ce type cellulaire d'une population de cellules NK.

Des essais de cytotoxicité ont montré que toutes les sous-populations de cellules Kurloff sont capables d'activité NK contre la cellule cible NK-sensible YAC-1. Cependant, les sous-populations de plus faible densité (1.048 à 1.076 g/ml) possèdent l'activité cytotoxique la plus importante. De plus, nos études ont montré que l'Acm du clone 14D1 ne semble pas potentialiser de façon significative l'activité cytotoxique des cellules Kurloff (1.076 à 1.100 g/ml), en comparaison avec le surnageant d'un Acm non-spécifique de même isotype que l'Acm 14D1 et le surnageant du myélome NSO.

La production d'Acm spécifiques contre les cellules Kurloff de cobaye représente un outil très utile qui permet d'étudier davantage les rôles de ces cellules dans la défense anti-tumorale chez le cobaye et dans la protection du placenta contre les mécanismes de défense immunitaire de la mère. Ces Acm pourraient aussi nous aider dans l'identification des cellules progénitrices des cellules Kurloff. Ce modèle animal est d'autant plus intéressant puisqu'il permet l'obtention d'un grand nombre de cellules Kurloff avec une pureté importante permettant ainsi des études plus extensives sur les différents mécanismes cytotoxiques de cellules NK.



## **REMERCIEMENTS**

Je désire exprimer mes remerciements à mon directeur de recherche, le Docteur Pierre Sirois, de m'avoir accepté dans ses laboratoires. Je lui suis reconnaissant de m'avoir permis de réaliser ce projet ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais également remercier les Docteurs Marek Rola-Pleszczynski et Jana Stankova pour leurs judicieux conseils et toute l'aide apportée dans la réalisation de ce projet. Je les remercie aussi de m'avoir donné accès à certains équipements dans leurs laboratoires.

À mon ami et confrère de travail, Karim Maghni, mes plus sincères remerciements pour son temps et sa générosité. Je garde un souvenir précieux de notre amitié et de toutes nos collaborations au cours de mes premières années d'études graduées.

Je remercie infiniment tous les étudiants et le personnel des laboratoires d'immunologie et de pharmacologie pour leur amitié et leur nombreuses contributions. Grâce à vous, mon séjour à l'Université de Sherbrooke a été des plus agréables.

À Pierre Magny et Denis Martel du Service de Microscopie Électronique de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke, mes remerciements pour leur aide et leurs conseils dans la réalisation des techniques d'immunoGold et d'Immunofluorescence.

Aux membres du jury, Dr Pierre Sirois, Dr Marek Rola-

Pleszczynski et Dr Gilles Dupuis, mes remerciements pour avoir accepté de consacrer du temps à la correction de ce mémoire.

À la Fondation du Dr Georges Phénix (Montréal, Qué.), la Faculté de médecine (Université de Sherbrooke, Qué.), le "Eastern Student Research Forum 1993" (University of Miami, FL) et à Francofonds (Saint-Boniface, Man.), toute ma gratitude pour leur soutien financier accordé au cours de cette maîtrise.



## **BIBLIOGRAPHIE**

- ADAMS, D.B. (1977). The effect of thymectomy in guinea pigs on the lymphocyte content of central lymph. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **55**: 49-57.
- ALEXEIEFF, A.-A. et JOUKOFF, N. (1928a). Recherches expérimentales sur les corps de Kurloff. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **98**: 34-36.
- ALEXEIEFF, A.-A. et JOUKOFF, N. (1928b). Recherches expérimentales sur les corps de Kurloff. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **98**: 446-448.
- ALTMAN, A. et RAPP, H. (1978). Natural cell-mediated cytotoxicity in guinea pigs: properties and specificity on natural killer cells. *J. Immunol.* **121**: 2244-2252.
- ATKINSON, E.A., GERRARD, J.M., HILDES, E. et GREENBERG, H. (1990). Studies of the mechanism of natural killer (NK) degranulation and cytotoxicity. *J. Leukocyte Biol.* **47**: 39-38.
- AVILA, J.L. et CONVIT, J. (1975). Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem. J.* **162**: 57-64.
- BABUDIERI, B. (1938). *Rend. Ist. Super. Sanita.* **1**: 99-232
- BERENDSEN, P.B. (1979). Phagocytic inability of Kurloff cells in the lung and spleen of the guinea pig. *Cell Tiss. Res.* **204**: 513-517.
- BIMES, C., GUILHEM, A., IZARD, J. et PONTONNIER, A.M.F. (1964).

Origine des lymphocytes à corps de Foà-Kurloff. Bull. Ass. Anat. (Nancy), **49**: 299-303.

BIRON, C.A. et WEISH, R.M. (1982). Activation and role of natural killer cells in virus infections. Med. Microbiol. Immunol. **170**: 155-172.

BISHOP, G.A. et HWANG, J. (1992). Use of a cellular ELISA for the detection of cell surface antigens. Biotechniques. **12**: 326-330.

BØYUM, A. (1976). Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. 5: Suppl. **5**: 9-15.

BØYUM, A.(1964). Separation of white blood cells. Nature. **204**: 793-794.

BRUNDA, M.J., HERBERMAN, R.B. et HOLDEN, H.T. (1980). Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. J. Immunol. **124**: 2682-2687.

BUAT, M.-L., LANDEMORE, G. et IZARD, J. (1988). Cytochemical localization of arylsulphatase in guinea-pig Kurloff cells. Acta Histochem. **84**: 211-215.

DEAN, M.F. et MUIR, H. (1975). Separation of a proteoglycan fraction from Kurloff cells stimulating protein synthesis in macrophages. Biochem. J. **146**: 557-563.

DEAN, M.F. et MUIR, H. (1971). Proteoglycans from sheep, pig, rat and



human spleens having chemical and biological resemblances to that in Kurloff cells. *FEBS Letters* **16**: 183-185.

DEAN, M.F. et MUIR, H. (1970). The characterization of a protein-polysaccharide isolated from Kurloff cells of guinea pig. *Biochem. J.* **118**: 783-790.

DEBOUT, C., BIREBENT, B., GRIVEAU, A.-M. et IZARD, J. (1993). In Vitro effect of Guinea-pig natural killer (Kurloff cells) on homologous leukemic cells (LC2). *Leukemia*. **7**: 733-735.

DEBOUT, C. GRIVEAU, A.M. et IZARD, J. (1991). The Kurloff cell in estrogenized guinea pigs as a CT7<sup>+</sup> 8BE6<sup>-</sup> MR-1<sup>-</sup> CT10<sup>-</sup> IgGM- lymphocyte with natural killer activity. *Nat. Immun. Cell Growth Reg.* **10**: 327-335.

DEBOUT, C., QUILLEC, M. et IZARD, J. (1984). Natural killer activity of Kurloff cells: A direct demonstration on purified Kurloff cell suspensions. *Cell. Immunol.* **87**: 674-677.

DEBOUT, C. EDERY, M., DROSDOWSKI, M. et IZARD, J. (1983). Increase in the number of Kurloff cells following estrogen stimulation in guinea pigs: demonstration of a latency period. *Bull. Assoc. Anatom.* **67**: 181-191.

DROLLER, M.J., SCHNEIDER, M.V. et PERLINAN, P. (1978). A possible role of prostaglandins in the inhibition of natural and antibody-

dependant cell-mediated cytotoxicity against tumor cells. *Cell. Immunol.* **124**: 2682-2687.

DUPLAN, J.F. (1954). *Compt. Rend. Séances Soc. Biol. Fil.* **148**: 974-975.

DVORAK, A.M., OSAGE, J.E., DVORAK, H.F. et GALLI, H.F. (1981).  
Surface membrane alterations in guinea pig basophils undergoing  
anaphylactic degranulation. *Lab. Invest.* **45**: 58-66.

EREMIN, O., COOMBS, R.R.A., ASHBY, J. et PLUMB, D. (1980 a).  
Natural cytotoxicity in the guinea-pig: the natural killer (NK) cell  
activity of the Kurloff cell. *Immunology.* **41**: 367-378.

EREMIN, O., WILSON, A.B., COOMBS, R.R.A., ASHBY, J. et PLUMB, D.  
(1980 b). Antibody-dependant cellular cytotoxicity in the guinea-pig:  
The role of the Kurloff cell. *Cell. Immunol.* **55**: 312-327.

ERNSTROM, U. et SANDBERG, G. (1971). On the origin of Foà-Kurloff  
cells. *Scand. J. Haematol.* **8**: 380-391.

FEIT, C., BARTAL, A.H., TAUBER, G., DYMBORT, G. et HIRSHAUT, Y.  
(1983). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the  
detection of monoclonal antibodies recognizing surface antigens  
expressed on viable cells. *J. Immunol. Methods.* **58**: 301-308.

FERRANTE, A. et THONG, Y.H. (1980). Optimal conditions for  
simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear

leucocytes from human peripheral blood by the Ficoll-Hypaque method. *J. Immunol. Methods*. **36**: 109-117.

FITZGERALD, P.A., EVANS, R., KIRKPATRICK, D. et LOPEZ, C. (1983). Heterogeneity on human NK cells: comparison of effectors that lyse HSV-1 infected fibroblasts and K562 erythroleukemia targets. *J. Immunol.* **130**: 1663-1667.

FLORENTIN, P. et BINDER, C. (1940). *Compt. Rend. Séances Soc. Biol. Fil.* **133**: 127-130.

FOÀ, P.U. et CARBONNE, T. (1889). Beitrage zur Histologie und Physiopathologie der Milz der Saugethiere. *Beitr. Path. Anat.* **5**: 227-252.

FREY, T. PETTY, H. et McCONNEL, H.M. (1982). Electron microscopic study of natural killer cell-tumor cell conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 5317-5321.

GALFRE, G., HOWE, S.C., MILSTEIN, C., BUTCHER, G.W. et HOWARD, J.C. (1977). Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature.* **266**: 550-552.

GARCIA-SUAREZ, J., PRIETO, A., REYES, E., MANZANO, L., MERINO, J.L. et ALVAREZ-MON, M. (1993). Severe chronic autoimmune thrombocytopenic purpura is associated with an expansion of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> natural killer cells subset. *Blood.* **82**: 1538-



1545.

GARZETTI, G.G., CIAVATTINI, A., PROVINCIALI, M., FABRIS, N., CIGNITTI, M. et ROMANINI C. (1993). Natural killer activity in endometriosis: correlation between serum estradiol levels and cytotoxicity. *Obst. Gynecol.* **85**: 665-668.

GUNJI, Y. VUYANOVIC, N.L., HISERODT, J.C., HERBERMAN, R.B. et GORELIK, E. (1989). Generation and characterization of purified adherent lymphokine-activated killer cells in mice. *J. Immunol.* **142**: 1748-1754.

HALLER, O., KIESSLING, R., ORN, A., et WIGTZELL, H. (1977). Generation of natural killer cells: An autonomous function of the bone marrow. *J. Exp. Med.* **145**: 1411-1416.

HANNA, N. et BURTON, C. (1981). Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *J. Immunol.* **127**: 1754-1758.

HANNA, N. et SCHNEIDER, M. (1983) Enhancement of tumor metastasis and suppression on natural killer cell activity by  $\beta$ -estradiol treatment. *J. Immunol.* **130**: 974-980.

HARLOW, E. et LANE, D. Antibodies, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory: New York (1988) pp. 139-243.

- HEINLE, R.W. et HEYDINGER, D.K. (1944). Filtering action of the guinea pig spleen for Foà-Kurloff cells. *J. Clin. Invest.* **23**: 942.
- HELINSKI, E.H., BOOTSMAN, G.H., McGROARTY, R.J., OVAK, G.M., DE HARVEN, E. and PAULY, J.L. (1990). Scanning electron microscopic study of immunogold-labeled human leukocytes. *J. Elec. Micros. Tech.* **14**: 298-306.
- HERBERMAN, R.B. (1986). Natural killer cells. *Am. Rev. Med.* **37**: 347-352.
- HERBERMAN, R. B. et ORTALDO, J.R. (1981). Natural cytotoxic cells: their role in defenses against disease. *Science.* **214**: 24-30.
- HERBERMAN, R.B., DJEU, J.Y., KAY, H.D., ORTALDO, J.R., RICCARDI, C., BONNARD, G.D., TOLDEN, H.T., FAGNANI, R., SANTONI, A. et PUCETTI, P. (1979). Natural killer cells: characteristics and regulation of activity. *Immunol. Rev.* **44**: 43-65.
- HERBERMAN, R.B. et HOLDEN, H.T. (1978). Natural cell-mediated immunity. *Adv. Cancer Res.* **27**: 305-377.
- HERCEND, T., GRIFFIN, J.D., BENSUSSAN, A., SCHMIDT, R.E., EDSON, M.A., BRENNAN, A., MURRAY, C., DAYLEY, J.F., SCHLOSSMAN, S.F. et RITZ, J. (1985). Generation of monoclonal antibodies to a human natural killerclone: characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1a and NKH2, expressed on subsets of large granular lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **75**: 932-943.

HISERODT, J.C., BRITVAN, L.J. et TARGAN, S.T. (1982).  
Characterization of the cytolytic reaction mechanism of the human  
natural killer cell-independent steps. *J. Immunol.* **129**: 1782-1787

HOSKIN, D.W. et RODER, J.C. (1992). Production and characterization of  
a novel antibody inhibitory for murine natural killer cell activity.  
*Immunol. Invest.* **21**: 11-23.

IZARD, J., BARRELIER, M.T. et QUILLEC, M. (1976). The Kurloff cell; Its  
differentiation in the blood and lymphatic system. *Cell. Tiss. Res.*  
**173**: 237-259.

JANEWAY, C.A. (1989). Natural killer cells: a primitive immune system.  
*Nature.* **341**: 108.

JOLLY, J. et FÉRESTER, M. (1929). *Compt. Rend. Séances Soc. Biol. Fil.*  
**101**: 767-769.

KARRE, K. (1991). MHC gene control of the natural killer system at the  
level of the target and the host. *Sem. Cancer Biol.* **2**: 295-309.

KINSKY, R.G., CHRISTIE, G.H., ELSON, J. et BERNARD, C. (1969).  
Extra-hepatic derivation of Kupffer cells during oestrogenic  
stimulation of parabiosed mice. *Br. J. Exp. Pathol.* **50**: 438-447.

KIPPS, T.J., PARHAM, P., PUNT, J., et HERZENBERG, L.A. (1985).



Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependant, cell-mediated cytotoxicity mediated by murine monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **161**:1-17.

KITTAS, C., PARSONS, M.A. et HENRY, L. (1979) A light and electron microscope study on the origin of Foà-Kurloff cells. *Br. J. Exp. Path.* **60**: 276-285.

KÖHLER, G. et MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **227**: 680-685.

KOLMER, W. (1912). *Pfluegers Arch. Gesante Physiol. Meschen Tiere.* **144**: 361-395.

KORTELAINEEN, L. et KORHONEN, L.K., (1976 a). Kurloff cells 1. Histochemical characteristics of the Kurloff bodies. *Acta Pathol. Micriobiol. Scand. - Section A, Pathology* **84**: 143-153.

KORTELAINEEN, L. et KORHONEN, L.K., (1976 b). Kurloff cells 2. Histochemical and morphological characteristics of the Kurloff cells. *Acta Pathol. Micriobiol. Scand. - Section A, Pathology* **84**: 154-164.

KURLOFF, M.G. (1889). Blood cells in splenectomized animals after one year of life. *VRACH.* **10**: 515-518. Cité par ERLICH et LAZARUS (1898). *Die Anemie, Vienna* et par NOTHNAGEL (1898). *Specielle Pathologie und Therapie, Vienna.* vol. viii, dir. I, pt. I: 56-57.

- LANDEMORE, G., DARBON, J-M., IZARD, J., BAYARD, F. et FAYET J-C. (1988) Presence of low affinity estrogen binding sites in guinea-pig Kurloff cells. *J. Steroid Biochem.* **31**: 97-100.
- LANDEMORE, G., BUAT, M.-L., et IZARD, J. (1987). Zymograms of Kurloff cell acid phosphatases. Thin layer isoelectric focussing and native polyacrylamide 4-15 % gradient gel electrophoresis. *Biol. Cell.* **59**: 97-100.
- LANDEMORE, G., DARBON, J.M. et IZARD, J. (1985). Electrophoretic characterization of the protein and glycoprotein content of purified Kurloff cell cytosol. *Biochimie.* **67**: 205-213.
- LANDEMORE, G., LETAIEF, S.-E., BOCQUET, J. et IZARD, J. (1984). Kurloff cell proteoglycans, Evidence of de novo synthesis of chondroitin sulfate proteoglycans by purified Kurloff cells. *Febs. Letters* **209**: 299-304.
- LANDEMORE, G., DEBOUT, C., QUILLEC, M. et IZARD, J. (1984). Isolation of Kurloff cells by Percoll density gradient centrifugation. Protein labeling with  $^{35}\text{S}$ -methionine of these cells. *Biol. Cell.* **50**: 121-126.
- LANDEMORE, G., QUILLEC M., DEBOUT C. et IZARD, J. (1983 a). Scanning electron microscopy of pure Kurloff cell suspensions. *Cell. Tis. Res.* **231**: 457-461.

- LANDEMORE, G., DARBON, IZARD, J. et IZARD, J. (1983 b). Lack of estradiol receptor in Kurloff cell cytosol. *Mol. Cell. Endocrinol.* **30**: 253-256.
- LANIER, L.L., PHILLIPS, J.H., HACKETT, J., TUTT, M. et KUMAR, V. (1986). Natural killer cells: Definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol.* **137**: 2735-2739.
- LEDINGHAM, J.C.G (1906). On the vacuolated mononuclear cells in the blood of the guinea pig. *Lancet.* **1**: 1675.
- LEDINGHAM, J.C.G. (1940). Sex hormones and the Foà-Kurloff cell. *J. Path. Bacteriol.* **50**: 210-219.
- LENDRUM, A.C. (1952) Distribution of Kurloff bodies in the viscera of female guinea-pigs. *J. Path. Bact.* **64**: 250.
- LEINATI, F. (1932). *Haematologica.* **13**: 517-528.
- LETAIEF, S.-E., LANDEMORE, G., BOCKET, J. et IZARD, J. (1989). Kurloff cell proteoglycans: presence of two main size-populations on intracellular protease-resistant proteochondroitin sulphate. Effect of D-xyloside. *Biology of the Cell.* **65**: 257-263.
- LITTLEFIELD, J.W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science.* **145**: 709-701.



LOTZOVA, E. et HERBERMAN R.D. NK cell mediated cytotoxicity: Receptors, Signaling and Mechanisms. E. Lotzova (Ed) et R.B. Herberman (Ed-assoc.): CRC Press Inc., FL (1992) p. 1-51.

LOUGHRAN, T.P., DEEG, H.J. et STORB, R. (1993). Inhibition of canine NK activity by anti-CD18 monoclonal antibody, UV irradiation and cyclosporine. *Exp. Hematol.* **21**: 411-413.

LUM, L.G. (1987). The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood.* **69**: 369-380.

MacDERMOTT, R.P., SCHMIDT, R.E., CAULFIELD, J.P., HEIN, A., BARTLEY, G.T., RITZ, J., SCHLOSSMAN, S.F., AUSTEN, K.F. et STEVENS, R.L. (1985). Proteoglycans in cell-mediated cytotoxicity. Identification, localization and exocytosis of a chondroitin sulfate proteoglycan from human clones natural killer cells during target cell lysis. *J. Exp. Med.* **162**: 1771-1787.

MAGHNI, K., BLANCHETTE, F. et SIROIS, P. (1993). Induction of lung eosinophilia and neutrophilia in guinea pigs following injection of sephadex beads. *Inflammation* **17**: 537-550.

MAGHNI, K., ROBIDOUX, C., LAPORTE, J., HALLÉ, A., BORGEAT, P. et SIROIS, P. (1991). Purification of natural killer-like Kurloff cells and arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins.* **43**: 251-267.

MARSHALL, A.H.E., SWETTENHAM, K.V., VERNON-ROBERTS, B. et PEVELL, P.A. (1971) Studies on the function of the Kurloff cell. *Int. Arch. Allergy*. **40**: 137-152.

MARSHALL, A.H.E., SWETTENHAM, K.V. et VERNON-ROBERTS, B. (1970). The function of the Kurloff cell and its possible relation to the immunological status of the guinea-pig placenta. *J. Anat.* **106**: 414-415.

MARSHALL, A.H.E. et SWETTENHAM, K.V. (1969). The formation of a mucoprotein-sulphated mucopolysaccharide complex in the lymphoid tissue of the pregnant guinea-pig. *J. Anat.* **93**: 348-353.

MAZIA, D., SCHATTEN, G. et SALE, W. (1975). Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J. Cell. Biol.* **66**: 198-200.

MORETTA, A., CICCONE, E., TAMBUSI, G., BOTTINO, C., VIALE, O., PENDE, D., SANTONI, A. et MINGARI, M.C. (1989). Surface molecules involved in CD3-negative NK cell function, a novel molecule which regulates the activation of a subset of human NK cells. *Int. J. Cancer Suppl.* **4**: 48-52.

MUIR, H. et MARSHALL, A.H.E. (1961). Chemistry of a mucopolysaccharide produced by guinea pig lymphocytes. *Nature*. **191**: 706.

ORTALDO, J.R. et HERBERMAN, R.H. (1984). Heterogeneity of natural

killer cells. *Ann. Rev. Immunol.* **2**: 359-394.

PAPANICOLAOU, G.N. (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Science*. **95**: 438-439.

PAPENHEIM, A. (1914). *Folia. Hematol. (Leipzig)* **18**: 224-226.

PARR, L.E., YOUNG, L.H.Y., PARR, M.B. et YOUNG, J.D.-E. (1990). granulated material gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol.* **145**: 2365-2372.

PARMLEY, R.T., RAHEMTULLA, F., COOPER, M.D. et RODEN, L. (1985). Ultrastructural and biochemical characterization of glycosaminoglycans in HNK-1-Positive large granular lymphocytes. *Blood*. **66**: 20-25.

PARMLEY, R.T., EGUCHI, M. et SPICER, S.S. (1979). Ultrastructural cytochemistry of complex carbohydrates in leucocyte granules. *J. Histochem. Cytochem.* **27**: 1167-1170.

PELÉ, J.-P., ROBIDOUX, C. et SIROIS, P. (1989). Guinea pig lung cells; Method of isolation and partial purification, identification ultrastructure and cell count. *Inflammation*. **13**: 103-123.

PERUSSIA, B, TRINCHIERI, G., JACKSON, A, WARNER, N.L. FRAUST, J., RUMPOLD, H., KRAFT, D. et LANIER, L.L. (1984).



The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional and comparative studies with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **133**: 180-189.

PERUSSIA, B. STAR, S., ABRAHAM, S., FANNING, V. et TRINCHIERI, G. (1983 a). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J. Immunol.* **130**: 2133-2141.

PERUSSIA, B. ACUTO, O., TERHORST, J. FAUST, J., LAZARUS, V., FANNING, V. et TRINCHIERI, G. (1983 b). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-region interaction on the lymphocyte membrane. *J. Immunol.* **130**: 2142-2148.

POULIOT, N. (1991). Caractérisation de l'activité cytotoxique naturelle des cellules Foà-Kurloff. Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke.

POULIOT, N, MAGHNI, K, SIROIS, P. et ROLA-PLESZCZYNSKI, M. (1990) The cytotoxic activity of the Foà-Kurloff cell. *FASEB J.* **4**: A1892.

PROSS, H.F., BAINES, M.G., RUBIN, P., SHRAGGE, P. et PATTERSON, M.S. (1981). Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell

activity. *J. Clin. Immunol.* **1**: 51-63.

PUCETTI, P., SANTONI, A., RICCARDI, C. et HERBERMAN, R.B. (1980). Cytotoxic effector cells with the characteristics of natural killer cells in the lungs of mice. *Int. J. Cancer.* **25**: 153-158.

QUILLEC, M., DEBOUT, C. et IZARD, J. (1977). Red cell and white cell counts in adult female guinea-pigs. *Pathol. Biol.* **25**: 443-446.

RANLOV, P., CHRISTENSEN, H.E. et WANSTRUP, J. (1970). Effects of thymectomy upon the formation of Foà-Kurloff cells in the Guinea-pig. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **78**: 330-332.

REVELL, P.A. (1977). The Kurloff cell. *Int. Rev. Cytol.* **51**: 275-314.

REVELL, P.A. (1974). Kurloff cell levels in the peripheral blood of normal and oestrogen treated guinea-pigs. *Int. Arch. All. Appl. Immunol.* **55**: 325-532.

REVELL, P.A., DEAN, M.F., VERNON-ROBERTS, B., MUIR, H. et MARSHALL, A.H.E. (1972). Inhibition of macrophage migration by a proteoglycan extracted from Kurloff cells of the guinea-pig. *Int. Arch. Allergy.* **43**: 813-825.

REVELL, P.A., VERNON-ROBERTS, B. et GRAY, A. (1971). The distribution and ultrastructure of the Kurloff cell in the Guinea-pig. *J. Anat.* **109**: 187-199.

- RICKWOOD, D., FORD, T.C. et GRAHAM, J. (1982). Nycodenz, a new nonionic iodinated density gradient medium. *Anal. Biochem.* **123**: 23-31.
- RITZ, J. (1989). The role of natural killer cells in immune surveillance. *N. Engl. J. Med.* **320**: 1748.
- RITZ, J., SCHMIDT, R.E., MICHON, J., HERCEND, T. et SCHLOSSMAN, S.F. (1988). Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv. Immunol.* **42**: 181-211.
- ROBERTSON, M.J., et RITZ, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. **76**: 2421-2438.
- RODER, C.J. et PROSS, H.F. (1982). The biology of the human natural killer cell. *J. Clin. Immunol.* **2**: 249-256.
- ROLA-PLESZCZYNSKI, M. GAGNON, L., et SIROIS, P. (1983). Leukotriene B<sub>4</sub> induces human suppressor lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**: 1531-1537.
- ROLA-PLESZCZYNSKI, M. (1980). In vitro induction of human cell-mediated cytotoxicity directed against herpes simplex virus-infected cells: characterization of the effector lymphocyte. *J. Immunol.* **125**: 1475-1480.



- ROOFE, P.G., LATIMER, H.B., MADISON, M., MAFFET, M. et WILKINSON, P. (1950). Comparison of peripheral blood with heart blood in guinea-pigs. *Science*. **111**: 337.
- ROONEY, C.M., WIMPERIS, J.Z., BRENNER, M.K., PATTERSON, J., HOFFBRAND, A.V. et PRENTICE, H.G. (1986). Natural killer cell activity following T-cell depleted allogenic bone marrow transplantation. *Br. J. Hematol.* **62**: 413-420.
- ROSS, E.H. (1912). The developpement of a leucocytozoon of guinea-pigs. *Proc. Roy. Soc.* **85**: 67-73.
- RUMPOLD, H., KRAFT, D., OBEXER, G., BOCK, G. and GEBHART, W. (1982). A monoclonal antibody against a surface antigen shared by human large granular lymphocytes and granulocytes. *J. Immunol.* 1458-1464.
- RUTH, R.F., ALLEN, C.P. et WOLFE, H.R. (1964) The effect of thymus on lymphoid tissue. Dans *The thymus in immunology*. R.A. Good et A.E. Gabrielsen (eds), Harper and Row, NY, pp. 183-205.
- SANDBERG, G. et HAGELIN, M. (1990). Lymphatic vessels and Kurloff cells in the thymus of estradiol-treated guinea pigs. *Cell Tiss. Res.* **259**: 316-369.
- SANDBERG, G. et HAGELIN, M. (1986). Kinetic study of Kurloff cells in guinea pig thymus. *Int. Arch. Allergy*. **80**: 267-273.

SCHILLING, V. (1909). *Folia Haematol. (Leipzig)* **7**: 225-232.

SCHMIDT, R.R., MacDERMOTT, R.P., BARTLEY, G., BERTOVICH, M., AMATO, D.A., AUSTEN, K.A., SCHLOSSMAN, S.F., STEVENS, R.L., et RITZ, J. (1985). Specific release of proteoglycans from natural killer cells during target lysis. *Nature*. **318**: 289-291.

SCHUURS, A.H.W.M. et VERHEUL, H.A.M. (1990). Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.* **35**: 157-172.

SCREPANTI, I., SANTONI, A., GULINO, A., HERBERMAN, R.B. et FRATI, L. (1987). Estrogen and anti-estrogen modulation of the levels of mouse natural killer activity and large granular lymphocytes. *Cell. Immunol.* **106**: 191-202.

SEAMAN, W.E., BLACKMAN, M.A., GINHART, T.D., ROUBINIAN, J.R., LOEB, J.L. et TALAL, N. (1978).  $\beta$ -estradiol reduces natural killer cells in mice. *J. Immunol.* **121**: 2193-2198.

SEMENSKAJA, E. (1930) *Compt. Rend. Séances Soc. Biol. Fil.* **105**: 771-773.

SEWELL, H.F., STEWART, L.S., McPHEE, C.A., MATHIE, I.H. et THOMPSON, A.W. (1988). Enhanced production and immunophenotypic analysis of Kurloff cells in Immunized Guinea pigs with cyclophosphamide and cyclosporine A: Correlation with

increased large granular lymphocyte production in the rat. Transplantation Proc. **20**: 196-201.

TAKASUGI, M., MICKEY, M.R. et TERASAKI, P.I. (1973). Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. Cancer Res. **33**: 2898-2902.

TARGAN, S.R. et NEWMAN, W. (1983). Definition of a "trigger" stage in the NK cytolytic reaction sequence by a monoclonal antibody to the glycoprotein T-200. J. Immunol. **131**: 1149-1153.

THOMPSON, A.W., McPHEE, C.A. et SEWELL, H.F. (1988). Increased production of Kurloff cells and accompanying lymphocyte subset changes in immunized Guinea-pigs treated with cyclophosphamide and cyclosporine A. Immunology. **63**: 477-482.

TIFFON, Y. BUAT, M.-L., LANDEMORE, G. et IZARD, J. (1986). Cytochemical localisation of acid phosphatase and trimetaphosphatase in Kurloff cells. Biol. Cell. **56**: 85-87.

TIMONEN, T, RANKI, A. SAKSELA, E. et HAYRY, P. (1979). Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and fonctionnal characterization of effector cells. Cell. Immunol. **48**: 121-132.

TORIBIO, M.L., DE LANDAZURI, M.O., et LOPEZ-BOTET, M. (1983). Induction of natural killer-like cytotoxicity in cultured human



thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **13**: 964-969.

TORTEN, M., SIDELL, N., et GOLUB, S.H. (1982). Interleukin 2 and stimulator lymphoblastoid cells will induce human thymocytes to bind and kill K562 targets. *Exp. Med.* **156**: 1545-1550.

TOSATTI, E. (1938). *Haematologica*. **19**: 495-506.

TRINCHIERI, G. (1989). Biology of natural cells. *Ad. Immunol.* **47**: 187-342.

VALLE, T. (1933). *Haematologica*. **14**: 181-195.

WARR, G. et SLJIVIC, V.S. (1973). Activity of the reticuloendothelial system and the antibody response: I. Effect of stilbestrol on RES activity and localization of sheep erythrocytes. *Br. J. Exp. Pathol.*, **54**: 56-68.

WELSH, R.A. (1966) Kurloff body formation in the Guinea pig lymphocyte. *J. Ultrastructure Res.* **14**: 556-570.

WILSON, A.B., et COOMBS, R.R.A. (1973). Rosette-formation between guinea-pig lymphoid cell and rabbit erythrocytes - a possible T-cell marker. *Int. Arch. Allergy.* **44**: 54-552.

WILSON, A.B., et COOMBS, R.R.A. (1971). Passive sensitization of tissue cells. IV. guinea-pig antibodies cytophilic for basophils and Kurloff

cells. *Int Arch. Allergy.* **40**: 19-46.

WILSON, A.B. et GURNER, B.W. (1975). Increased affinity of guinea pigs thymocytes and thymus-dependant lymphocytes for papain-treated rabbit erythrocytes compared to untreated erythrocytes. *J. Immunol. Meth.* **7**: 163-168.

WOODCOCK, H.M. (1921). An introduction to the study of haematophagy. *J. Roy. Arm. Med. Corps.* **37**: 321-341.

WRIGHT, S.C., WEITZEN, M.L., KAHKE, R., GARNER, G.A. et BONAVIDA, B. (1983). Studies on the mechanism of natural killer cytotoxicity. II. Coculture of human PBL with NK-sensitive or resistant cell lines stimulates release of natural killer cytotoxic factors (NKCF) selectively cytotoxic to NK-sensitive target cells. *J. Immunol.* **130**: 2479-2483.

YOUNG, J.D.-E. et COHN, Z.A. (1987). Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv. Immunol.* **41**: 269-321.

Note: Les références sans titres (cités par REVELL (1977)) n'ont pas été trouvées.

## **APPENDICE**



## 8.1 LISTE D'ARTICLE

1. Maghni K., **Blanchette F.** and Sirois P. Induction of lung eosinophilia and neutrophilia in guinea pigs following injection of Sephadex beads. 1993. *Inflammation* 17: 537-50.

## 8.2 LISTE DE RÉSUMÉS

1. **Blanchette F.**, Maghni K., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Pouliot N. et Sirois P. Production et purification d'anticorps monoclonaux contre les cellules Foa-Kurloff de cobaye. *Annales de l'ACFAS*, 60: 219, 1992.
2. **Blanchette F.**, Maghni K., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Pouliot N. et Sirois P. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux contre les cellules Foa-Kurloff de cobaye. *Journée Scientifique de la Faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke*. 21<sup>e</sup> édition, 44, 1992.
3. **Blanchette F.**, Maghni K., Stankova J., Rola-Pleszczynski M., Turcotte.S., Pouliot N. et Sirois P. Détermination de la spécificité d'anticorps monoclonaux contre les cellules Foa-Kurloff de cobaye. *Médecine/Sciences*, suppl.2, 33,1992.
4. Maghni K., Cloutier S., **Blanchette F.** et Sirois P. Modulation de l'hyperréactivité bronchique chez le cobaye par diverses substances pharmacologiques. *Médecine/Sciences*, suppl.2, 158,1992.
5. **Blanchette F.**, Maghni K., Pouliot N., Stankova J., Rola-Pleszczynski M. and Sirois P. Monoclonal Antibodies and Guinea Pig Foa-Kurloff Cell Subpopulations. *Eastern Student Research Forum*, 19<sup>th</sup> edition, 66, 1993.
6. Maghni K., Lanoue C., Cloutier S., Cristol J-P., **Blanchette F.**, Cadieux A. and Sirois P. Characterization of a New Model of

Bronchial Hyperreactivity and Airway Eosinophilia in Guinea Pigs. Eastern Student Research Forum, 19<sup>th</sup> edition, 55, 1993.

7. **Blanchette F.**, Maghni K., Pouliot N., Stankova J., Rola-Pleszczynski M. et Sirois P. Sous-populations de cellules Foa-Kurloff de cobaye et anticorps monoclonaux. Annales de l'ACFAS, 61: 202, 1993.
8. Maghni K., Cloutier S., **Blanchette F.** et Sirois P. Étude de l'hyperréactivité bronchique et de l'éosinophilie pulmonaire chez le cobaye. Annales de l'ACFAS, 60: 206, 1993.
9. Maghni K., Lanoue C., Cloutier S., Cristol J-P., **Blanchette F.**, Cadieux A. and Sirois P. New Model of Bronchial Hyperreactivity and Airway Eosinophilia in Guinea Pigs. National Student Research Forum, 1993 (accepté).
10. Maghni K., Lanoue C., Cloutier S., Cristol J-P., **Blanchette F.**, Cadieux A. and Sirois P. New Model of Bronchial Hyperreactivity and Airway Eosinophilia in Guinea Pigs. Cells and Cytokines in Lung Inflammation, 1: 92, 1993
11. Maghni K., Cloutier S, **Blanchette F.**, and Sirois P. (SPON: Domenico Regoli). Effect of Various Pharmacological Substances in Bronchial Hyperreactivity and Airway Eosinophilia in Guinea Pigs. The Pharmacologist, 35: 121, 1993.
12. **Blanchette F.**, Maghni K., Stankova J., Rola-Pleszczynski M et Sirois P. Développement d'Anticorps Monoclonaux pour la Caractérisation des Sous-Populations de Cellules Kurloff. Médecine/Sciences, suppl.1, 54, 1993.
13. Maghni K., Cloutier S, **Blanchette F.**, et Sirois P. Étude de la Relation entre l'Hyperréactivité Bronchique et l'Inflammation Pulmonaire. Médecine/Sciences, suppl.1, 52, 1993.

14. Maghni K., Cloutier S., Simard, M., Arsenault D., **Blanchette F.**, et Sirois P. Relation entre l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire chez le cobaye injecté avec des billes de Sephadex. Annales de l'ACFAS (1993) (accepté).
15. Maghni K., Cloutier S., Simard, M., Arsenault D., **Blanchette F.**, et Sirois P. Development of bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in guinea pigs following injection with Sephadex beads. American Thoracic Society (1993) (accepté).
16. Maghni K., Cloutier S., Arsenault D., Simard, M., **Blanchette F.**, et Sirois P. Bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in guinea pigs following Sephadex bead injection. XII<sup>th</sup> International Congress of Pharmacology. (1994) (accepté).